

LILIAN NOINDORF

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO OPERON *orf1glnKamtB*
E DO GENE *amtH* DE *Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Leda Satie Chubatsu pela sua orientação, apoio e ensinamentos, fundamentais para o bom transcorrer desta tese e para minha formação.

Ao professor Emanuel M. de Souza pelas discussões, sugestões e interesse e à professora Maria Berenice R. Steffens pela co-orientação.

Aos professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial a professora Liu Un Rigo pela leitura da tese e pelas sugestões. Ao professor Geoff Yates pelas correções e atenção dispensados.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalho e pela chance do desenvolvimento desta tese.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus professores e funcionários pelo auxílio e amizade. Em especial à Dona Julieta, à Roseli Prado e ao Valter pela prestatividade e carinho demonstrados.

À Rose Adele pela amizade e companheirismo demonstrados durante todos estes anos.

Aos meus amigos de laboratório pela amizade, carinho, risadas, ajuda e dedicação demonstrados. Em especial aos companheiros da sala 271, André, Luíza e Luciano.

À Fabiane Rego pela amizade, prestatividade e auxílio na manipulação do material radioativo. À Ana Claudia pela amizade e concessão de alguns plasmídeos.

Ao Projeto Genopar pela concessão de seqüências e plasmídeos.

Ao CNPq, a CAPES, ao programa PRONEX e à FUNFAR pelo suporte financeiro.

Aos meus pais Roseli e Daniel Noindorf e ao meu irmão Marcel que sempre me incentivaram, ajudaram e torceram por mim.

Um agradecimento muito especial ao meu querido Marcus pelo companheirismo, paciência e carinhos infinitos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fixação biológica de nitrogênio	1
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1
1.3 Nitrogenase.....	2
1.4 Assimilação de amônio	4
1.5 O sistema <i>ntr</i>	5
1.5.1 O sistema NtrB/NtrC	6
1.5.2 As proteínas GlnB e GlnK.....	6
1.5.3 Modificação covalente das proteínas PII em resposta aos níveis de nitrogênio.....	9
1.5.4 Controle da atividade de NtrB e NtrC por GlnB e GlnK em <i>E. coli</i>	10
1.5.5 Controle da atividade da glutamina sintetase por GlnB e GlnK em <i>E. coli</i>	13
1.5.6 Formação de heterotrímeros de GlnB e GlnK	14
1.6 Transportadores de amônio.....	14
1.7 Complexo GlnK-AmtB.....	17
1.8 Participação das proteínas Amt B e PII na regulação da fixação de nitrogênio	18
1.8.1 Controle da atividade de nitrogenase.....	18
1.8.2 Controle da atividade da proteína NifA por proteínas do tipo PII.....	19
1.8.2.1 Controle da atividade de NifA por GlnK em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
1.8.2.2 Controle da atividade de NifA por GlnK em <i>Azotobacter vinelandii</i>	20

1.8.2.3 Controle da atividade da proteína NifA em <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	21
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Bactérias e plasmídeos	23
3.2 Condições de cultivo	27
3.2.1 Composição dos meios de cultura	27
3.2.2 Antibióticos	29
3.2.3 Manutenção de estirpes bacterianas	29
3.3 Purificação do DNA total de <i>H. seropedicae</i>	30
3.4 Purificação de DNA plasmidial	30
3.5 Análise eletroforética de DNA	31
3.6 Condições de digestão de DNA com enzimas de restrição	31
3.7 Preparo dos vetores	31
3.8 Ligação de DNA	32
3.9 Transformação bacteriana por eletroporação	32
3.9.1 Preparo de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	32
3.9.2 Preparo de células de <i>H. seropedicae</i> eletrocompetentes.....	33
3.9.3 Transformação bacteriana.....	33
3.10 Transferência de plasmídeos por conjugação	33
3.11 Sequenciamento de DNA	34
3.11.1 Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento.....	34
3.11.2 Reação de sequenciamento.....	34
3.11.3 Tratamento da amostra após reação de sequenciamento	35
3.12 Construção das fusões transcricionais <i>orf1::lacZ</i> e <i>glnK::lacZ</i>	35
3.13 Construção do mutante <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i>.....	35

3.13.1 Construção do plasmídeo pSUPamtBCTc.....	35
3.13.2 Obtenção da estirpe mutante <i>amtB::Tc^R</i> de <i>H. seropedicae</i>	36
3.14 Construção da estirpe mutante <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>.....	40
3.14.1 Construção do plasmídeo pSUPamtHClacZ.....	40
3.14.2 Obtenção da estirpe mutante <i>amtH::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i>	40
3.15 Construção da estirpe mutante <i>amtBamtH</i> de <i>H. seropedicae</i>.....	42
3.16 Construção das estirpes mutantes <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>	42
3.16.1 Construção do mutante <i>glnK::sacB</i> de <i>H. seropedicae</i>	42
3.16.1.1 Amplificação por PCR do fragmento que contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> ...	42
3.16.1.2 Construção do plasmídeo pSUPglnKsacB	43
3.16.1.3 Obtenção do mutante <i>glnK::sacB</i> de <i>H. seropedicae</i>	45
3.16.2 Construção da estirpe mutante <i>glnKdel</i> de <i>H. seropedicae</i>	45
3.16.2.1 Construção do plasmídeo pSUPglnKdel	45
3.16.2.2 Obtenção da estirpe mutante <i>glnKdel</i> de <i>H. seropedicae</i>	47
3.17 Construção da estirpe mutante <i>orf1del</i> de <i>H. seropedicae</i>	50
3.17.1 Construção do plasmídeo pSUPorf1delsacB	50
3.17.2 Obtenção da estirpe mutante <i>orf1del</i> de <i>H. seropedicae</i>	50
3.18 Construção da estirpe mutante <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i>	51
3.19 Construção das fusões cromossomais <i>amtB::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i>	51
3.19.2 Obtenção da fusão cromossomal <i>amtB::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i>	53
3.20 Hibridização do DNA cromossomal das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>	53
3.20.1 Transferência do DNA do gel de agarose para membrana de náilon	53
3.20.2 Preparo da sonda.....	54
3.20.3 Hibridização	54
3.21 Determinação da atividade de transporte de metilamônio.....	54
3.22 Determinação da atividade de transporte de amônio.....	55
3.23 Determinação da atividade da nitrogenase	55

3.24 Ensaio de inibição reversível da nitrogenase	56
3.25 Construção dos plasmídeos para complementação das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>	56
3.25.1 Construção do plasmídeo pLAFR3.18OGA.....	56
3.25.2 Construção do plasmídeo pLAFR3.18nifACT	58
3.25.3 Construção do plasmídeo pLAFR3.18orf1	58
3.26 Determinação de atividade biossintética da glutamina sintetase	61
3.27 Determinação da atividade de β-galactosidase	61
3.29 Dosagem de proteínas.....	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Análise <i>in silico</i> dos genes <i>orf1</i> e <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	63
4.1.1 Análise da sequência do gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i>	63
4.1.2 Análise da sequência do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	68
4.2 Análise da expressão do operon <i>orf1glnKamtB</i>.....	73
4.3 Obtenção das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>.....	81
4.3.1 Obtenção da estirpe mutante <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i>	81
4.3.2 Mutagênese do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	84
4.3.3 Construção do duplo mutante <i>amtBamtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	87
4.3.4 Construção das estirpes mutantes <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>	87
4.3.4.1 Amplificação e clonagem do gene <i>glnK</i> completo de <i>H. seropedicae</i>	87
4.3.4.2 Obtenção do mutante <i>glnK::lacZ-Km^R</i>	90
4.3.4.3 Obtenção da estirpe mutante <i>glnKdel</i>	93
4.3.5 Construção do mutante <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i>	97
4.3.6 Construção do mutante <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i>	98
4.4 Fisiologia das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>.....	102
4.4.1 Determinação da expressão da fusão <i>amtB::lacZ-Km^R</i> nas estirpes de SmR1, LN <i>glnKdel</i> e LN <i>orf1del</i> <i>H. seropedicae</i>	102
4.4.2 Análise da expressão do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	104

4.4.3 Determinação da atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) nas estirpes de <i>H. seropedicae</i>	104
4.4.4 Determinação da atividade de transporte de amônio e metilamônio nas estirpes SmR1, LNamtB, LNamtH e LNamtBamtH de <i>H. seropedicae</i>	106
4.4.5 Ensaio de desligamento da nitrogenase nas estirpes SmR1 e LNamtB de <i>H. seropedicae</i>	111
4.4.6 Determinação da atividade de nitrogenase nas estirpes de <i>H. seropedicae</i>	114
4.4.7 Expressão dos genes <i>nifA</i> e <i>nifB</i> nas estirpes SmR1 e LNglnK de <i>H. seropedicae</i>	120
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
6 CONCLUSÕES.....	123
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura tridimensional dos monômeros das proteínas GlnB e GlnK de <i>E. coli</i>	8
Figura 2 – Cascata controladora do sistema Ntr em <i>E. coli</i>	11
Figura 3 – Modelo estrutural da proteína AmtB de <i>E. coli</i>	16
Figura 4 – Esquema da construção do plasmídeo pMPporf1	37
Figura 5 – Esquema da construção do plasmídeo pPWpglnK.....	38
Figura 6 – Esquema da construção dos plasmídeos pSUPamtBCTc e pSUPamtBClacZ	39
Figura 7 – Esquema da construção do plasmídeo pSUPamtHClacZ.....	41
Figura 8 – Esquema da construção do plasmídeo pSUPglnKsacB	44
Figura 9 – Esquema da construção do plasmídeo pUC18glnKdel	48
Figura 10 – Esquema da construção do plasmídeo pSUPglnKdelsacB.....	49
Figura 11 – Esquema da construção do plasmídeo pSUPorf1delsacB.....	52
Figura 12 – Esquema da construção do plasmídeo pLAFR3.18OGA.....	57
Figura 13 – Esquema da construção do plasmídeo pLAFR3.18nifACT	59
Figura 14 – Esquema da construção do plasmídeo pLAFR3.18orf1	60
Figura 15 – Sequência de nucleotídeos dos genes <i>orf1</i> , <i>glnK</i> e <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> e seus produtos de tradução	64
Figura 16 – Sequência de nucleotídeos do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i> e seu produto de tradução.....	70
Figura 17 – Alinhamento das proteínas AmtB e AmtH de <i>H. seropedicae</i> com outras proteínas pertencentes a família Amt	74
Figura 18 – Hibridização de DNA genômico das estirpes SmR1 e LNamtB de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pSUPamtBCTc	82
Figura 19 – Esquema da recombinação homóloga ocorrida para produzir a estirpe LNamtB de <i>H. seropedicae</i>	83
Figura 20 – Hibridização de DNA genômico das estirpes SmR1 e LNamtH de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pSUPamtHClacZ	85

Figura 21 – Esquema da recombinação homóloga ocorrida na estirpe L _{NamtH} de <i>H. seropedicae</i>	86
Figura 22 – Hibridização de DNA genômico das estirpes SmR1 e L _{NamtBamtH} de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pSUP _{NamtBCTc}	88
Figura 23 – Hibridização de DNA genômico das estirpes SmR1 e L _{NamtBamtH} de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pSUP _{NamtHClacZ}	89
Figura 24 – Hibridização do DNA genômico da estirpe L _{NglnK} de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pSUP _{glnKsacB}	91
Figura 25 – Esquema da recombinação homóloga ocorrida na construção da estirpe L _{NglnK} de <i>H. seropedicae</i>	92
Figura 26 – Esquema da recombinação homóloga ocorrida na estirpe L _{NglnKdel} de <i>H. seropedicae</i>	95
Figura 27 - Produto de amplificação por PCR obtido do DNA genômico de <i>H. seropedicae</i> utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GlnKF1 e GlnKR1	96
Figura 28 - Produto de amplificação por PCR obtido do DNA genômico de <i>H. seropedicae</i> utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Orf1F e Orf1R	99
Figura 29 – Hibridização do DNA genômico da estirpe L _{NglnB} de <i>H. seropedicae</i>	100
Figura 30 – Esquema da recombinação homóloga ocorrida na estirpe L _{NglnB} de <i>H. seropedicae</i>	101
Figura 31 – Atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) nas diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i>	107
Figura 32 - Transporte de metilamônio em <i>H. seropedicae</i> estirpes SmR1, L _{NamtB} , L _{NamtH} e L _{NamtHamtB}	109
Figura 33 – Transporte de amônio nas estirpes SmR1, L _{NamtB} , L _{NamtH} e L _{NamtBamtH} de <i>H. seropedicae</i>	110
Figura 34 – Inibição reversível da nitrogenase pela adição de íons amônio nas estirpes SmR1 e L _{NamtB} de <i>H. seropedicae</i>	113
Figura 35 – Atividade de nitrogenase nas diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i>	115

Figura 36 – Atividade de nitrogenase nas estirpes mutantes <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> complementadas com diferentes plasmídeos	117
Figura 37 – Atividade de nitrogenase na estirpe mutante LNorfl ^{del} de <i>H. seropedicae</i> complementada com diferentes plasmídeos.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias e plasmídeos.....	23
Tabela 2 – Antibióticos	29
tabela 3 – Expressão das fusões <i>orf1::lacZ</i> , <i>glnK::lacZ</i> e <i>amtB::lacZ</i> em <i>H. seropedicae</i>	80
Tabela 4 – Atividade de β -galactosidase das estirpes LNamtBlacZ, LNglNkamtBlacZ e LNorflamtBlacZ de <i>H. seropedicae</i>	103
Tabela 5 – Atividade de β -galactosidase da fusão cromossomal <i>amtH::lacZ</i> -Km ^R	105
Tabela 6 – Atividade de β -galactosidase das fusões <i>nifA::lacZ</i> E <i>nifB::lacZ</i> nas estirpes SmR1 e LNglNk	121

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	=	5' difosfato de adenosina
AMP	=	5' monofosfato de adenosina
Amp	=	Ampicilina
ATase	=	Enzima adeniltransferase
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
Cm	=	Cloranfenicol
CTAB	=	Brometo de cetiltrimetilamônio
D.O.	=	Densidade ótica
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
DraG	=	Dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	=	Dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase
e ⁻	=	Elétron
EDTA	=	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
F	=	Faraday
GDH	=	Glutamato desidrogenase
GLN	=	Glutamina
GlnB-UMP	=	Proteína GlnB uridililada
GlnK-UMP	=	Proteína GlnK uridililada
GLU	=	Glutamato
GOGAT	=	Glutamato sintase
GS	=	Glutamina sintetase
GS-AMP	=	Proteína GS adenililada
IHF	=	Fator de integração do hospedeiro
kΩ	=	Quilohms

kb	=	Quilopares de base
kDa	=	Quilodalton
Km	=	Canamicina
kV	=	Quilovolts
L	=	Litro
N ₂ ase	=	Nitrogenase
NAD ⁺	=	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	=	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	=	Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	=	Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NtrC-P	=	Proteína NtrC fosforilada
ONPG	=	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactosídeo
pb	=	Pares de base nucleotídeos
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
Pi	=	Fosfato inorgânico
RBS	=	Sítio de ligação para ribossomo
rpm	=	Rotações por minuto
SDS	=	Dodecilsulfato de sódio
Sm	=	Streptomomicina
Tc	=	Tetraciclina
Tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	=	Unidade enzimática
UMP	=	5' monofosfato de uracila
UTase	=	Uridililtransferase
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

RESUMO

As proteínas Amt constituem uma família de transportadores de amônio encontrados em procariotos, fungos, plantas e animais. Em *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio, dois genes codificando para prováveis transportadores de amônio foram identificados, *amtB* e *amtH*. O gene *amtB* é co-transcrito com os genes *orf1* e *glnK*, que codificam, respectivamente, uma provável proteína de membrana externa, sem função conhecida, e GlnK, uma proteína transdutora de sinal. A expressão do operon *orf1glnKamtB* é aumentada sob condições limitantes de nitrogênio e é dependente da proteína NtrC. A proteína AmtB é necessária para a captação de metilamônio em *H. seropedicae*, e provavelmente está envolvida no transporte de amônio. Esta proteína está envolvida também na inativação reversível da nitrogenase após a adição de íons amônio. Nenhuma função foi identificada para a proteína AmtH. As proteínas GlnK e GlnB fazem parte da família PII de proteínas. A proteína GlnK é necessária para a ativação da proteína NifA, ativador transcricional dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio. A proteína GlnB também é capaz de ativar a proteína NifA, porém um mutante *glnB* de *H. seropedicae* apresentou fenótipo Nif⁺, sugerindo que GlnK é o regulador primário da atividade de NifA.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; *glnK*; *amtB*; *orf1*; *amtH*

ABSTRACT

Amt proteins constitute a family of ammonium transporters found in prokaryotes, fungi, plants and animals. In *Herbaspirillum seropedicae*, a nitrogen fixing endophytic bacterium, two genes coding for probable ammonium transporters were identified and named *amtB* and *amtH*. The *amtB* gene is co-transcribed with *orf1* and *glnK* genes, that in turn, code for a probable outer membrane protein with unknown function and a signal transduction protein, respectively. The expression of *orf1glnKamtB* operon is increased under nitrogen limiting conditions in a NtrC- dependent manner. The AmtB protein is necessary for the methylammonium uptake in *H. seropedicae*, suggesting that this protein is involved in the ammonium transport to the cell. This protein is also involved in nitrogenase post-translational regulation in *H. seropedicae*, being necessary for NH_4^+ -dependet nitrogenase switch-off. No function was identified for the AmtH protein. The GlnK and GlnB protein belong to the PII protein family. The GlnK protein is necessary for the activation of NifA, the transcriptional activator protein of the genes involved in nitrogen fixation. The GlnB protein is also capable of activating NifA, although a *H. seropedicae glnB* mutant is Nif^+ , suggesting that GlnK controls NifA activity in *H. seropedicae*.

Key-words: *Herbaspirillum seropedicae*; *glnK*; *amtB*; *orf1*; *amtH*

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento essencial para a sobrevivência de todos os organismos, sendo necessário para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. O ar atmosférico contém aproximadamente 78% de dinitrogênio ou nitrogênio molecular (N₂), que é metabolicamente indisponível para a maioria dos seres vivos.

A fixação biológica de nitrogênio é o processo enzimático pelo qual o nitrogênio atmosférico é convertido em amônio, que pode ser utilizado na construção de biomoléculas. O catalisador biológico para este processo é o complexo enzimático nitrogenase (BURRIS, 1991). A capacidade para fixar nitrogênio ocorre apenas em procariotos e está amplamente distribuída entre as bactérias e arqueas. Os organismos capazes de fixar nitrogênio são denominados diazotrofos (YOUNG, 1992).

O nitrogênio é o elemento que mais freqüentemente limita o crescimento vegetal e é o mais caro dos fertilizantes agrícolas (PEDROSA, 1987). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenado pode provocar sérios danos ecológicos, uma vez que 50% do total aplicado são usualmente perdidos pela ação de chuvas, erosão e da atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Entre os efeitos do uso de fertilizantes nitrogenados podemos destacar a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, a eutrofização de lagos e rios e a acidificação do solo (DIXON e KAHN, 2004).

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo endofítico encontrado no interior de gramíneas como trigo, milho, arroz, sorgo, cana de açúcar, algumas espécies de gramíneas forrageiras e palmeiras oleaginosas (BALDANI et al., 1986; BODDEY et al., 1995; PIMENTEL et al., 1991; OLIVARES et al., 1996; JAMES et al., 1998). Esta bactéria é classificada, com base na análise de seqüências de rRNA,

como membro da subdivisão β das Proteobactérias (YOUNG, 1992). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e muito móvel. Apresenta 0,6 a 0,7 μm de diâmetro e 1,5 a 5 μm de comprimento e possui de um a três flagelos em um ou ambos os pólos (BALDANI et al., 1986). É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI et al., 1986).

A inoculação de arroz com *H. seropedicae* leva a um aumento do peso úmido e seco das plantas (BALDANI et al., 1996). Quando variedades de arroz tolerantes ao alumínio foram colonizadas pela estirpe de *H. seropedicae* Z67 ocorreu o aumento do crescimento e acumulação de nitrogênio (GYANESHWAR et al., 2002). Outros estudos mostraram que a estirpe de *H. seropedicae* (LR15) inoculada em arroz foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, e resultou em aumento da biomassa radicular (RONCATO-MACCARI et al., 2003). A história de certas regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil revela que existem áreas cultivadas por mais de cem anos sem adubação nitrogenada sugerindo que a fixação biológica de nitrogênio possa contribuir significativamente para o metabolismo nitrogenado da planta. Entre os possíveis fixadores de nitrogênio que contribuem para este efeito estão os endófitos *Herbaspirillum* spp e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DOBERËINER, 1992). Estes resultados indicam que o *H. seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante.

1.3 NITROGENASE

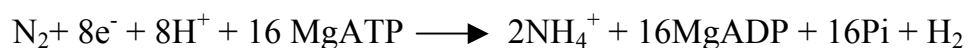
O complexo da nitrogenase consiste de duas metaloproteínas, a proteína ferro (Fe) ou dinitrogenase redutase e a proteína ferro-molibdênio (FeMo) ou dinitrogenase (HOWARD e REES, 1996).

A proteína Fe é um dímero constituído de duas subunidades γ idênticas que são codificadas pelo gene *nifH* e ligadas por um núcleo 4Fe-4S (HOWARD e REES, 1994). Cada subunidade apresenta massa molecular de aproximadamente 30 kDa. A proteína Fe é o único doador de elétrons para a proteína FeMo, com a transferência de

elétrons acoplada à hidrólise de ATP (HOWARD e REES, 1996). A proteína FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com massa molecular de aproximadamente 230 kDa (HOWARD e REES, 1994). A subunidade α com massa molecular de 55 kDa é codificada pelo gene *nifD*. A subunidade β possui massa molecular de 60 kDa e é codificada pelo gene *nifK* (ROBERTS et al., 1978; KIM e REES, 1994). O tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ contém 2 átomos de molibdênio, 30 átomos de ferro e 32 átomos de enxofre organizados em 4 núcleos metálicos de 2 tipos diferentes: o núcleo P (FeS) e o cofator ferro-molibdênio (FeMoco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um núcleo P e um cofator FeMoco (SCHINDELIN et al., 1997).

A redução do N_2 , catalisada pela enzima nitrogenase, envolve três tipos básicos de reação de transferência de elétrons. Inicialmente, ocorre a redução da proteína Fe por um doador de elétrons, como flavodoxina ou ferredoxina; em seguida, um elétron da proteína-Fe é transferido para o núcleo P da proteína FeMo, em um processo dependente de Mg.ATP, com estequiometria mínima de duas moléculas de Mg.ATP por elétron transferido. A terceira etapa é a transferência do elétron do núcleo P para o cofator FeMoco que é responsável pela ligação e redução do substrato (N_2) (HOWARD e REES, 1996).

A estequiometria da redução do N_2 a NH_4^+ , catalisada pela nitrogenase foi estabelecida por SIMPSON e BURRIS (1984) como:



A nitrogenase catalisa não apenas a redução de dinitrogênio a amônio, mas também a redução de prótons a hidrogênio molecular e a redução de diversos substratos alternativos como acetileno, azida e cianeto (HOWARD e REES, 1996).

Além dos genes estruturais *nifHDK*, a biossíntese e atividade da nitrogenase dependem de produtos codificados por outros genes *nif*, essenciais para o transporte de elétrons, regulação da transcrição e maturação dos componentes da nitrogenase (MERRICK, 1992). Os genes *nif* de *H. seropedicae* estão organizados em uma única região de aproximadamente 30 kb contendo os genes *nifA* e *nifB* contíguos (SOUZA et

al., 1991a) e o operon *nifHDKENX* (MACHADO et al., 1996; KLASSEN et al., 1999), além de outros genes envolvidos na fixação de nitrogênio (Programa Genopar). A proteína NifA é responsável pela ativação da transcrição dos demais genes *nif* (SOUZA et al., 1991a). A análise da região promotora do gene *nifA* revelou a presença de sítios para ligação das proteínas NtrC, IHF (fator de integração do hospedeiro), NifA e σ^N -RNA polimerase (SOUZA et al., 1991b). A transcrição do gene *nifA* é dependente primariamente das proteínas NtrC e σ^{54} (PEDROSA et al., 1997; WASSEM et al., 2000), e é reprimida por amônio. Altos níveis de oxigênio exercem um pequeno efeito repressor sobre a expressão do gene *nifA* (SOUZA et al., 1999; WASSEM et al., 2002).

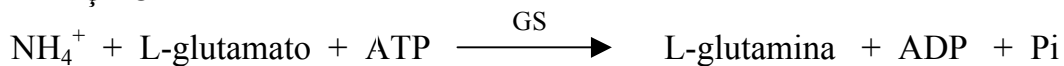
1.4 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

O amônio é o composto nitrogenado mais facilmente utilizado na maioria dos procariotos e também aquele que proporciona a maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas (MERRICK e EDWARDS, 1995). O amônio formado no processo de redução de N_2 atmosférico ou captado do meio externo é utilizado para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, estes últimos compostos servem de doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas.

A assimilação do amônio nos procariotos pode ocorrer por duas vias: a) glutamina sintetase (GS) (reação 1) e glutamato sintase (GOGAT) (reação 2) e b) glutamato desidrogenase (GDH) (reação 3) (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A enzima GS converte glutamato e amônio em glutamina e a enzima GOGAT transfere um grupamento amida da glutamina para o α -cetoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato. A reação global é a produção de glutamato a partir de amônia e α -cetoglutarato (MERRICK e EDWARDS, 1995). A via da glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a aminação redutiva do α -cetoglutarato pela amônia resultando na formação de glutamato através de uma reação dependente de NADPH (MERRICK e EDWARDS, 1995).

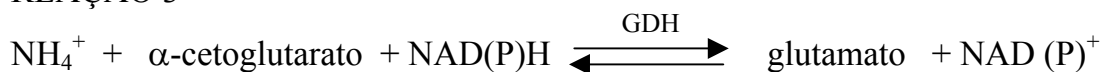
REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



A via GDH é utilizada quando as células crescem na presença de alta concentração de amônio, enquanto a via GS/GOGAT ocorre em condições limitantes de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995). Por apresentar um K_M para NH_4^+ alto (cerca de 1 mmol/L), a glutamato desidrogenase é ineficiente na assimilação de amônio durante o crescimento celular sob condições limitantes de amônio (MERRICK e EDWARDS, 1995).

1.5 O SISTEMA *Ntr*

O sistema *ntr* controla o metabolismo geral de nitrogênio, regulando a utilização de amônio e de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato, aminoácidos e N_2 em proteobactérias (DRUMMOND et al., 1983).

Em enterobactérias o sistema *ntr* é composto por sete proteínas: NtrB (produto do gene *ntrB*), NtrC (produto do gene *ntrC*), GlnD ou UTase (produto do gene *glnD*), GlnB (produto do gene *glnB*), GlnE ou ATase (produto do gene *glnE*), GlnK (produto do gene *glnK*) e glutamina sintetase (GS) ou GlnA (produto do gene *glnA*). O sistema *ntr* tem sido mais bem estudado em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Klebsiella pneumoniae* (citado em ZHANG et al., 2001a). A proteína AmtB (produto do gene *amtB*) também tem sido considerada como integrante do sistema *ntr* de *E. coli* (JAVELLE e MERRICK, 2005).

1.5.1 O sistema NtrB/NtrC

As proteínas NtrB e NtrC pertencem a uma família de reguladores de dois-componentes. A proteína NtrB possui duas atividades: histidina quinase (fosforila NtrC) e fosfatase (desfosforila NtrC). A interconversão das duas atividades depende dos níveis de nitrogênio e carbono celular (NINFA e MAGASANIK, 1986; KEENER e KUSTU, 1988; ATKINSON et al., 1994; JIANG e NINFA, 1999). Sob condições limitantes de amônio NtrB liga ATP e catalisa sua autofosforilação em um resíduo de histidina conservado. O grupamento fosforil é então transferido para um resíduo de aspartato da proteína NtrC (KEENER e KUSTU, 1988; WEISS e MAGASANIK, 1988; NINFA e BENNETT, 1991; NINFA et al., 1993). A proteína NtrC quando fosforilada age como um ativador transcricional de genes envolvidos na fixação e assimilação de nitrogênio. Em concentrações elevadas de amônio a proteína NtrB apresenta atividade de fosfatase, desfosforilando a proteína NtrC e inativando-a.

1.5.2 As proteínas GlnB e GlnK

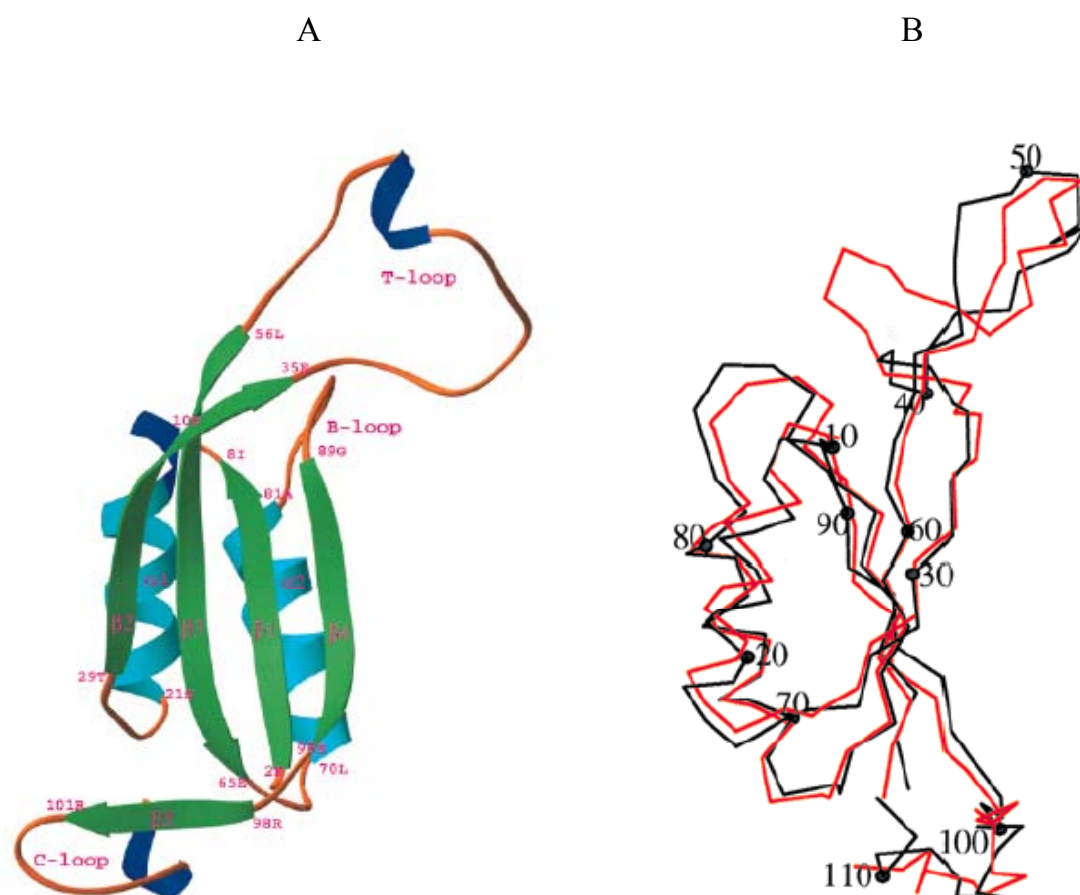
Em procariotos as variações na disponibilidade de nitrogênio são percebidas através de proteínas transdutoras de sinal do tipo PII (JAVELLE e MERRICK, 2005). Estas proteínas têm sido encontradas em algas e plantas, mas não foram identificadas em fungos e animais (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

Em *E. coli* duas proteínas do tipo PII foram identificadas: GlnB e GlnK (SON e RHEE, 1987; van HEESWIJK et al., 1996). O gene *glnK* faz parte de um operon *glnKamtB*, onde o gene *amtB* codifica para uma proteína transportadora de amônio (JAVELLE et al., 2005). A presença de duas ou mais proteínas do tipo PII foi descrita em diversos organismos (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). As proteínas GlnB e GlnK são similares, tanto estruturalmente quanto funcionalmente. Em *E. coli* ambas são compostas de 112 resíduos de aminoácidos que são 67% idênticos e apresentam estrutura terciária bastante semelhante. Tanto GlnB quanto GlnK formam homotrímeros *in vivo* (VASUDEVAN et al., 1994; XU et al., 1998). Os monômeros destas proteínas apresentam três motivos estruturais em volta (loop-B,

loop-C e loop-T) (figura 1) (XU et al., 1998; CARR et al., 1996; CHEAH et al., 1994). Os trimeros formam uma estrutura em barril, com a região do loop-T estendida acima desta estrutura (CARR et al., 1996; XU et al., 1998). A maior diferença estrutural entre GlnB e GlnK está na região do loop-T, onde se encontra o resíduo de tirosina 51, covalentemente modificado em resposta aos níveis de nitrogênio. O loop-T apresenta 18 resíduos de aminoácidos que formam uma região flexível não estruturada. A sequência de aminoácidos dessa região nas proteínas GlnB e GlnK é bastante similar, diferindo em apenas três resíduos. Esta região é necessária para a interação da proteína GlnB com suas proteínas-alvo (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

Diferente de GlnB, cuja expressão é constitutiva, a expressão de GlnK é regulada pelo sistema NtrB/NtrC, havendo aumento na expressão desta proteína em células cultivadas na ausência de amônio (THOMAS, COUTTS e MERRICK, 2000). A única exceção é a proteína GlnK de *Azotobacter vinelandii*, cuja expressão não é regulada por nitrogênio (MELETZUS et al., 1998).

Em *H. seropedicae* duas proteínas do tipo PII foram identificadas, GlnB e GlnK (BENELLI et al., 1997; NOINDORF, 2002). A proteína GlnB tem expressão constitutiva (BENELLI et al., 1997), enquanto que a expressão da proteína GlnK é aumentada sob condições limitantes de amônio e é dependente de NtrC (NOINDORF, 2002). O gene *glnK* é co-transcrito com o gene *amtB* (NOINDORF, 2002). As proteínas GlnK e GlnB de *H. seropedicae* apresentam 78% de identidade. A proteína GlnB é uridililada no resíduo tirosina 51 pela proteína GlnD, reação estimulada por ATP e α -cetoglutarato e inibida por glutamina. Já a desuridililação de GlnB é dependente de glutamina e inibida por ATP e α -cetoglutarato (BENELLI et al., 2001). A proteína GlnB foi purificada e cristalizada (BENELLI et al., 2002a). A comparação da estrutura das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* e GlnB de *H. seropedicae* revelou que embora a sequência de aminoácidos da proteína GlnB de *H. seropedicae* apresente maior identidade com a proteína GlnB de *E. coli*, a sua estrutura tri-dimensional é similar a da proteína GlnK. A maior diferença entre estas proteínas está na região do loop-T e do loop-C (BENELLI et al., 2002a). Essas regiões aparentemente estão envolvidas na transdução de sinal pela proteína GlnB (BONATTO et al., 2005).

FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS MONÔMEROS DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *E. coli*

Painel A – Estrutura do monômero da proteína GlnK de *E. coli*. Os diferentes motivos estruturais estão mostrados em diferentes cores (XU et al., 1998).

Painel B – Sobreposição da estrutura dos monômeros das proteínas GlnK (preto) e GlnB (vermelho) de *E. coli* (XU et al., 1998).

1.5.3 Modificação covalente das proteínas PII em resposta aos níveis de nitrogênio

As proteínas do tipo PII de proteobactérias são covalentemente modificadas por uridililação em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular (JAVELLE e MERRICK, 2005). Esta modificação é controlada pela proteína GlnD (UTase), cuja atividade é controlada alostericamente pela glutamina, um indicador dos níveis intracelulares de nitrogênio (JIANG, PELISKA e NINFA, 1998a). A proteína GlnD possui duas atividades catalíticas distintas: em condições limitantes de nitrogênio, quando a concentração de glutamina intracelular é baixa, ela tem atividade de uridililtransferase e catalisa a adição do grupamento UMP ao resíduo de tirosina 51 de cada subunidade das proteínas PII, produzindo PII mono, di ou tri-uridililada. Em condições de excesso de nitrogênio os níveis de glutamina estão elevados e GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP (BROWN et al., 1971; ADLER, PURICH e STADTMAN, 1975; BLOOM et al., 1978; BUENO et al., 1985; ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; FRANCIS e ENGLEMAN, 1978; GARCIA e RHEE, 1983; KAMBEROV et al., 1994; van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1998) (figura 2).

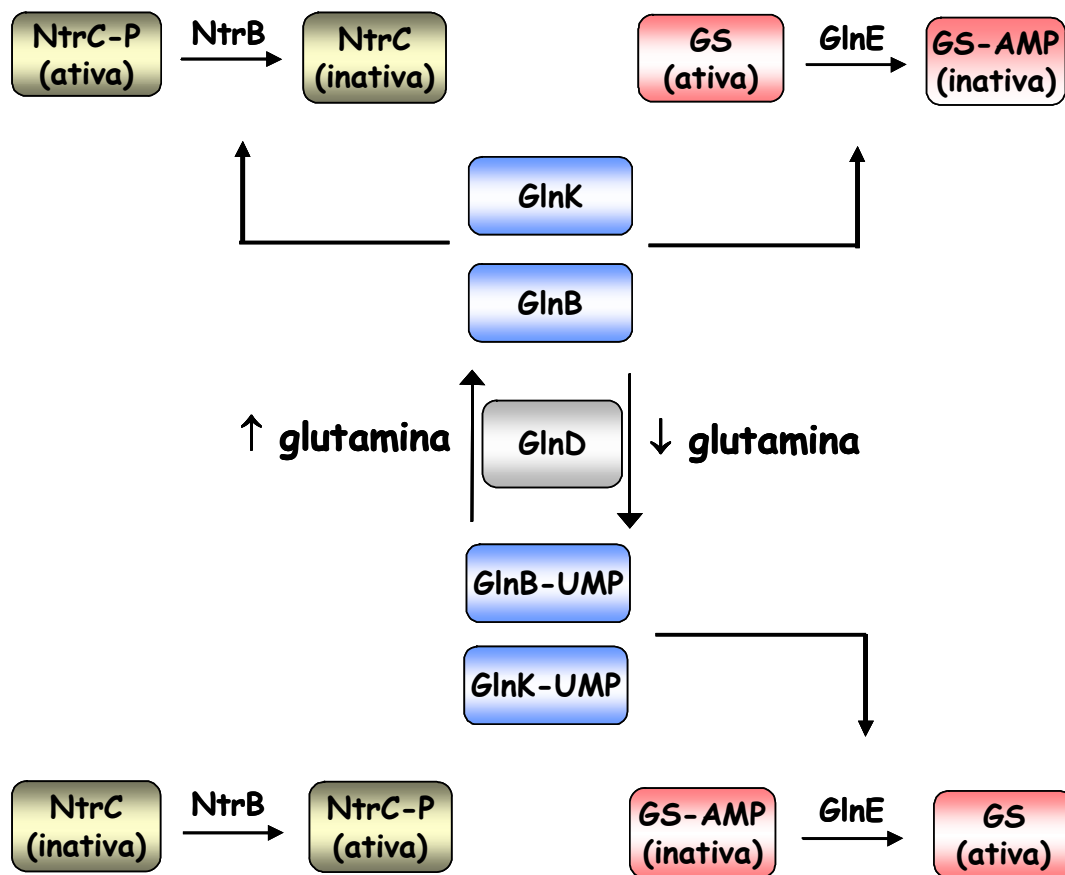
As proteínas PII agem também como sensoras dos níveis de α -cetoglutarato, indicador dos níveis intracelulares de carbono. A relação glutamina/ α -cetoglutarato na célula aumenta em condições de suficiência de nitrogênio e diminui em condições de privação (SENIOR, 1975; KUSTU et al., 1984). Cada uma das subunidades das proteínas PII apresenta um sítio para ligação de α -cetoglutarato. A ligação de uma molécula de α -cetoglutarato ao trímero de PII diminui a afinidade dos sítios restantes para ligação de moléculas adicionais. Isto faz com que estas proteínas estejam saturadas apenas em altas concentrações de α -cetoglutarato (JIANG e NINFA, 1999). Cada uma das subunidades das proteínas PII apresenta também um sítio para ligação de ATP. Os trímeros de PII estão saturados em concentrações fisiológicas de ATP (NINFA e JIANG, 2005). A ligação de ATP e α -cetoglutarato é necessária para a uridililação e desuridililação das proteínas PII de *E. coli* pela proteína GlnD. Estudos

in vitro mostraram que a concentração de α -cetoglutarato na célula é sempre suficiente para promover a uridililação e desuridililação de GlnB, e que portanto, a interação de GlnB com a enzima GlnD não é afetada pela concentração de α -cetoglutarato (JIANG, PELISKA e NINFA, 1998a). A ligação de α -cetoglutarato controla a interação de PII com seus outros receptores (NtrB e GlnE) (JIANG e NINFA, 1999).

Estudos *in vitro* mostraram que a desuridililação de GlnK pela UTase é mais lenta que a desuridililação de GlnB (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1999). Outra diferença entre GlnB e GlnK é que, em células cultivadas em condições limitantes de nitrogênio, GlnB encontra-se completamente uridililada, enquanto a uridililação de GlnK é apenas parcial (van HEESWIJK et al., 1996; HE et al., 1998). Assim, nessas condições é possível identificar a presença de GlnB-UMP, GlnK e GlnK-UMP (van HEESWIJK et al., 1996).

1.5.4 Controle da atividade de NtrB e NtrC por GlnB e GlnK em *E. coli*

Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína GlnB encontra-se na sua forma uridililada (BROWN et al., 1971; ADLER, PURICH e STADTMAN, 1975; BLOOM et al., 1978; BUENO et al., 1985; ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; FRANCIS e ENGLEMAN, 1978; GARCIA e RHEE, 1983; KAMBEROV et al., 1994). GlnB-UMP não interage com NtrB (ATKINSON et al., 1994) que nesta forma possui atividade de proteína quinase (JIANG e NINFA, 1999). A atividade quinase de NtrB leva a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. Em condições de excesso de nitrogênio, a proteína GlnB encontra-se desuridililada (BROWN et al., 1971; ADLER, PURICH e STADTMAN, 1975; BLOOM et al., 1978; BUENO et al., 1985; ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; FRANCIS e ENGLEMAN, 1978; GARCIA e RHEE, 1983; KAMBEROV et al., 1994). GlnB desuridililada interage com NtrB, inibindo sua atividade de quinase e ativando sua atividade de fosfatase (JIANG e NINFA, 1999) (figura 2).

FIGURA 2 – CASCATA CONTROLADORA DO SISTEMA Ntr EM *E. coli*

Em condições de excesso de nitrogênio a proteína GlnD possui atividade de enzima removedora de UMP, desuridililando GlnB e GlnK. GlnB e GlnK não-uridililadas interagem com a proteína NtrB estimulando a desfosforilação de NtrC, que se torna inativa. GlnB e GlnK não-uridililadas interagem também com GlnE, estimulando a inativação da GS por adenililação. Em condições limitantes de nitrogênio a proteína GlnD catalisa a adição do grupamento UMP às proteínas PII. GlnB-UMP e GlnK-UMP não são capazes de interagir com NtrB. Neste caso, a atividade quinase de NtrB é dominante e ela catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. GlnB-UMP e GlnK-UMP interagem com GlnE, estimulando a desadenililação da GS, a qual passa a catalisar a produção de glutamina.

A proteína GlnB controla a atividade de NtrB também em resposta aos níveis de α -cetoglutarato (JIANG e NINFA, 1999). Em baixas concentrações desse efetor, apenas uma subunidade do trímero de GlnB está ligada a uma molécula de α -cetoglutarato. Nesta forma GlnB interage com NtrB, inibindo sua atividade de quinase e estimulando a de fosfatase. Já em elevadas concentrações de α -cetoglutarato, todos os três sítios de GlnB estarão ocupados e, nesta forma, GlnB é incapaz de ligar NtrB que vai agir como uma quinase para fosforilar NtrC (JIANG e NINFA, 1999). Os níveis de NtrC-P vão depender, portanto, dos níveis intracelulares de glutamina (controla a atividade de GlnD) e α -cetoglutarato. Elevadas concentrações de glutamina impedem o acúmulo de NtrC-P, enquanto que elevadas concentrações de α -cetoglutarato estimulam sua produção.

GlnK parece interagir com NtrB de maneira semelhante a GlnB (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1998; 1999). Porém, GlnK tem um pequeno efeito na expressão de promotores que respondem a baixas concentrações de NtrC-P, o que sugere que GlnK é menos eficiente do que GlnB em reduzir o nível de NtrC-P (ATKINSON e NINFA, 1998). Entretanto, GlnK é capaz de regular promotores *ntr* que requerem uma elevada concentração de NtrC-P para sua ativação, como por exemplo, o promotor *glnK* (ATKINSON e NINFA, 1998). Assim, na ausência de GlnB, GlnK age através de NtrC para regular seu próprio promotor e outros promotores *ntr* (ATKINSON e NINFA, 1998). Embora não seja necessária para a regulação de NtrB em células contendo GlnB, GlnK pode apresentar função na regulação fina de NtrB quando a disponibilidade de nitrogênio é baixa (condição na qual GlnK é expressa) (ATKINSON e NINFA, 1999). Nesta condição estão presentes GlnB-UMP, GlnK e GlnK-UMP (van HEESWIJK et al., 1996; HE et al., 1998). A presença de GlnK não-modificada nestas condições aparentemente assegura que a proteína NtrB apresente sempre alguma atividade de fosfatase, garantindo uma resposta celular rápida na transição para concentrações elevadas de amônio (ATKINSON e NINFA, 1998; BLAUWKAMP e NINFA, 2002).

1.5.5 Controle da atividade da glutamina sintetase por GlnB e GlnK em *E. coli*

Em *E. coli* a atividade da glutamina sintetase (GS) também é regulada pelos níveis intracelulares de glutamina e α -cetoglutarato. Essa regulação é feita através de sua adenililação reversível, que é controlada pela enzima bifuncional adenililtransferase (Atase ou GlnE) (BROWN et al., 1971; JIANG, PELISKA e NINFA, 1998b). Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a enzima GlnE complexada à proteína GlnB-UMP desadenilila a GS, ativando-a (BROWN et al., 1971). Na forma desadenililada GS catalisa a síntese de glutamina a partir de amônio e ATP (KEENER e KUSTU, 1988). Em altos níveis de nitrogênio fixado, GlnE complexa com GlnB não-modificado e glutamina. Nesta forma, GlnE catalisa a adenililação da glutamina sintetase, inativando-a (BROWN et al., 1971; JIANG, PELISKA e NINFA, 1998b). Quando a concentração de glutamina é elevada, uma baixa concentração de GlnB é necessária para a adenililação da GS, enquanto em baixas concentrações de glutamina, uma elevada concentração de GlnB é necessária (JIANG, PELISKA e NINFA, 1998b). Na ausência de GlnB, glutamina estimula a adenililação da GS (JIANG, PELISKA e NINFA, 1998b).

O número de moléculas de α -cetoglutarato ligadas a GlnB também controla a sua capacidade de interagir com GlnE. Em alta concentração de α -cetoglutarato, os três sítios de GlnB estão ocupados tornando a proteína incapaz de se ligar a GlnE, o que impede a adenililação da GS. Em baixa concentração de α -cetoglutarato, quando GlnB encontra-se ligada apenas a uma molécula desse efector, a ligação GlnB-GlnE parece ser favorecida (JIANG e NINFA, 1999).

A proteína GlnK também interage com GlnE, regulando a atividade da glutamina sintetase (van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1998, 1999). O controle da adenililação da GS é essencialmente normal em mutantes GlnB ou GlnK de *E. coli*, sugerindo que as duas proteínas são suficientes para seu controle (ATKINSON e NINFA, 1999). Entretanto, experimentos *in vitro* mostraram que GlnB é aproximadamente 40 vezes mais potente do que GlnK na ativação da adenililação da GS, sugerindo que GlnB é o regulador primário de GlnE (van HEESWIJK et al., 1996;

ATKINSON e NINFA, 1999).

1.5.6 Formação de heterotrímeros de GlnB e GlnK

Em *E. coli* a expressão simultânea de GlnB e GlnK *in vivo* resulta na formação dos heterotrímeros GlnK₂GlnB e GlnB₂GlnK e dos homotrímeros de GlnB₃ e GlnK₃ (van HEESWIJK et al., 2000). A percentagem destas espécies moleculares varia de acordo com a disponibilidade intracelular de nitrogênio. Em células cultivadas em condições limitantes de nitrogênio, onde existe uma forte expressão da proteína GlnK, a concentração de (GlnB-UMP)₃ é muito baixa, predominando as espécies (GlnK-UMP)₃, GlnB-UMP(GlnK-UMP)₂ e (GlnB-UMP)₂GlnK-UMP (van HEESWIJK et al., 2000). Experimentos *in vitro* mostraram que homotrímeros de GlnB-UMP estimulam a desadenililação da GS-AMP, enquanto que homotrímeros de GlnK-UMP não. Heterotrímeros uridililados retêm a capacidade de estimular a desadenililação de GS-AMP, embora em uma menor extensão do que (GlnB-UMP)₃, o que sugere que apenas a subunidade GlnB-UMP dos heterotrímeros é ativa. Esses resultados mostram que a formação de heterotrímeros proporciona uma regulação fina do controle da GS em *E. coli* (van HEESWIJK et al., 2000).

1.6 TRANSPORTADORES DE AMÔNIO

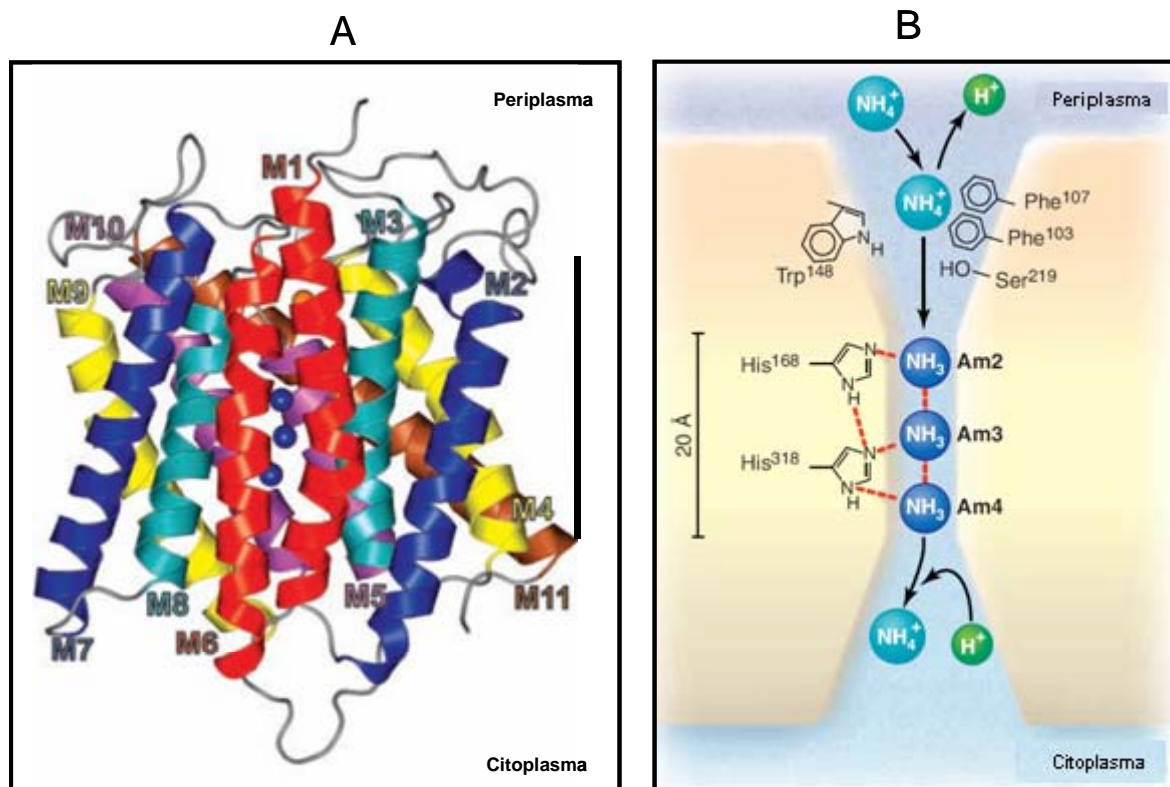
O amônio presente no meio pode ser assimilado por muitas bactérias, fungos, algas e plantas superiores. O transporte de amônio para dentro da célula pode ocorrer por difusão passiva da sua forma não protonada NH₃. Quando a concentração de amônio extracelular é elevada, a difusão através da membrana celular é suficiente para promover o crescimento celular. Porém, em concentrações limitantes de amônio, a presença de sistemas transportadores é necessária (KLEINER, 1985).

Os primeiros transportadores de amônio isolados e caracterizados funcionalmente foram os transportadores de alta afinidade Mep1 e Amt1 de *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (MARINI et al., 1994; NINNEMANN et al., 1994). Desde então, proteínas relacionadas foram

encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais (von WIREN e MERRICK, 2004). Estas proteínas constituem a família Mep/Amt.

Quase todos os procariotos apresentam pelo menos uma proteína do tipo Amt e em alguns casos duas ou mais proteínas estão presentes (von WIREN e MERRICK, 2004). A maioria das bactérias que não apresentam proteínas Amt são bactérias patogênicas, cujos genomas sofreram uma redução evolutiva (THOMAS, COUTTS e MERRICK, 2000).

Membros da família Mep/Amt são proteínas integrais de membrana contendo entre 9 e 12 hélices transmembrana. A análise estrutural de diversas proteínas Amt mostra que a maioria apresenta a região C-terminal voltada para o citoplasma (von WIREN e MERRICK, 2004). As proteínas AmtB de *E. coli* e Amt-1 de *Archaeoglobus fulgidus* foram purificadas, cristalizadas e suas estruturas foram determinadas por difração de raios-X (KHADEMI et al., 2004; ZHENG et al., 2004; ANDRADE et al., 2005). Ambas apresentam 11 hélices transmembrana e formam trímeros *in vivo*. Em *E. coli* o gene *amtB* codifica para uma pré-proteína onde os 22 resíduos N-terminais constituem um peptídeo sinal que é clivado na proteína madura, fazendo com que a sua região N-terminal fique voltada para o periplasma (von WIREN e MERRICK, 2004). A determinação da estrutura da proteína AmtB de *E. coli* indica fortemente que as proteínas transportadoras de amônio são canais condutores de amônia (NH₃) ao invés de transportadores de íons amônio (NH₄⁺) (KHADEMI et al., 2004; ZHENG et al., 2004). Pelo modelo proposto, uma molécula de NH₄⁺ se ligaria a um vestíbulo periplasmático da proteína AmtB. Esta molécula seria então desprotonada e transportada através de um canal hidrofóbico para interior da célula, onde seria novamente protonada. Cada monômero forma um canal para transporte de NH₃ (figura 3).

FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA AmtB DE *E. coli*

Painel A – Estrutura tridimensional do monômero da proteína AmtB cristalizada na presença de sulfato de amônio. A barra vertical representa a posição da porção hidrofóbica da membrana plasmática. As esferas azuis representam as moléculas de NH_3 . M1 a M11 representam as hélices transmembrana.

Painel B – Modelo do transporte de amônio pela proteína AmtB. Uma molécula de NH_4^+ se ligaria ao vestibulo periplasmático da proteína AmtB. Esta molécula seria então desprotonada e transportada através de um canal hidrofóbico para interior da célula, onde seria novamente protonada (KHADEMI et al., 2004).

Proteínas humanas Rh apresentam homologia com proteínas da família Mep/Amt (MARINI et al., 1997). A proteína eritrocitária humana RhAG é capaz de transportar amônio quando expressa em eritrócitos (RIPOCHE et al., 2004), leveduras (MARINI et al., 2000; WESTHOFF et al., 2004) e oócitos de *Xenopus* (WESTHOFF et al., 2002; WESTHOFF et al., 2004). As proteínas RhBG e RhCG, presentes no fígado, rins, cérebro, pele e testículos também são capazes de transportar amônio quando expressas em oócitos de *Xenopus* (BAKOUH et al., 2004; LUDEWIG, 2004). Estas proteínas podem ter função importante na detoxificação celular e excreção de íons amônio (MARINI et al., 2006).

1.7 COMPLEXO GlnK-AmtB

A transcrição conjunta dos genes *glnK* e *amtB* nos diversos organismos levou à sugestão de que estas duas proteínas interagiriam fisicamente (THOMAS, COUTTS e MERRICK, 2000). Posteriormente, foi determinado que as proteínas GlnK de *E. coli* e *Azotobacter vinelandii* ligam-se à membrana celular de maneira dependente da proteína AmtB, agindo como um regulador negativo do transporte de amônio (COUTTS et al., 2002). O complexo formado é reversível e ocorre dentro de segundos em resposta a mudanças na concentração extracelular de amônio. A ligação de GlnK a membrana é dependente do estado de uridililação de GlnK: GlnK não modificada liga-se a membrana mas não GlnK-UMP. A ligação de GlnK a membrana requer a porção C-terminal de AmtB, sugerindo que esta região constitui o sítio de interação para proteínas da família PII (COUTTS et al., 2002). GlnK também se liga a membrana de maneira dependente de AmtB em *Corynebacterium glutamicum* (STROSSER et al., 2004) e *Bacillus subtilis* (DETSCH e STULKE, 2003). Estas observações indicam que esta interação constitui uma nova via de transdução de sinal, que pode ser comum a todos os procariotos (JAVELLE e MERRICK, 2005).

Uma consequência do seqüestro de GlnK por AmtB é a rápida diminuição dos níveis intracelulares de GlnK livre no citoplasma. Como GlnK é um ativador da atividade de fosfatase de NtrB (ATKINSON E NINFA, 1999), a desuridililação de GlnK em resposta a um choque de amônio poderia levar à rápida ativação da atividade

de fosfatase de NtrB e conseqüentemente a desfosforilação de NtrC e inibição da transcrição de promotores NtrC dependentes, incluindo o operon *glnKamtB*. O seqüestro de GlnK não-uridililada evitaria a desfosforilação de NtrC em resposta a mudanças transitórias na concentração extracelular de amônio (JAVELLE et al., 2004).

1.8 PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS AmtB E PII NA REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

1.8 CONTROLE DA ATIVIDADE DE NITROGENASE

A fixação de nitrogênio é um processo que apresenta um alto gasto energético, sendo necessária uma regulação precisa da expressão e da atividade de nitrogenase. A adição de amônio a células fixando nitrogênio causa um rápido desligamento da atividade da nitrogenase. O controle pós-traducional da nitrogenase em alguns diazotrofos como *Azospirillum brasilense*, *Azoarcus* sp. e *Rhodobacter capsulatus* envolve a modificação covalente da proteína Fe ou dinitrogenase redutase (FU et al., 1989; LUDDEN e ROBERTS, 1989; MASEPOHL, KREY e KLIPP, 1993; ZHANG et al., 1997). Quando amônio é adicionado a culturas desreprimidas destes microrganismos uma das subunidades da proteína Fe é ADP-ribosilada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase (DraT, produto do gene *draT*) (POPE et al., 1985; LOWERY et al., 1986; LOWERY e LUDDEN, 1988; JOUANNEAU et al., 1989). Quando o amônio é consumido, a proteína dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG, produto do gene *draG*) remove o grupamento ADP-ribosil da dinitrogenase redutase, restaurando sua atividade (LUDDEN e BURRIS, 1976; SAARI et al., 1984; SAARI et al., 1986). Em *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *Azoarcus* sp. a proteína AmtB é necessária para que ocorra modificação da dinitrogenase em resposta a adição de amônio (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002; KLASSEN et al., 2001; KLASSEN et al., 2005; HUERGO et al., 2006).

A inibição da atividade de nitrogenase sem modificação da dinitrogenase redutase foi descrita para algumas bactérias fixadoras de nitrogênio como *H. seropedicae* (FU e BURRIS, 1989), *Azotobacter vinelandii* (LAANE et al., 1980; KLUGKIST e HAAKER, 1884), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BURRIS et al., 1991), *Anabaena variabilis* (DURNER et al., 1994), *Azospirillum amazonense* (HARTMANN, FU e BURRIS, 1986) e *Rhodobacter sphaeroides* (JONES e MONTY, 1979; HAAKER et al., 1982; YOCH et al., 1988). Estas bactérias não possuem o sistema DraT/DraG e o mecanismo de regulação pós-traducional da nitrogenase permanece desconhecido. LAANE e colaboradores (1980) sugeriram que em *A. vinelandii* o desligamento de nitrogenase deve-se ao desequilíbrio do fluxo de elétrons para a nitrogenase.

1.8.2 Controle da atividade da proteína NifA por proteínas do tipo PII

1.8.2.1 Controle da atividade de NifA por GlnK em *Klebsiella pneumoniae*

A proteína NifA é o ativador da transcrição dos operons *nif* incluindo os genes estruturais da nitrogenase *nifHDK*. A regulação da transcrição dos genes *nif* depende do controle da expressão e da atividade da proteína NifA (MERRICK, 1992).

Em *K. pneumoniae* o gene *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL* cujo produto (proteína NifL) modula a atividade de NifA em resposta aos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (GOVANTES, MOLINA-LOPEZ e SANTERO, 1996; HENDERSON, AUSTIN e DIXON, 1989; MONEY et al., 1999). A expressão do operon *nifLA* ocorre em baixos níveis de íons amônio e necessita do fator σ^{54} da RNA polimerase e da proteína ativadora NtrC (MERRICK, 1992; 1993). Em elevadas concentrações de amônio a proteína NifL interage com a proteína NifA inibindo sua atividade. Já em baixas concentrações de amônio, NifL não interage com NifA que pode então ativar a transcrição dos genes *nif*. Em condições limitantes de nitrogênio e ausência de oxigênio a proteína NifL encontra-se associada à membrana celular, impedindo a formação do complexo NifA-NifL no citoplasma (KLOPPROGGE et al.,

2002).

Os níveis de nitrogênio intracelular são sentidos pela proteína GlnK, que transmite o sinal para o sistema regulatório NifA-NifL. Em *K. pneumoniae* GlnK é necessária para o efeito inibitório de NifL sobre NifA (JACK et al., 1999; HE et al., 1998; ARCONDÉGUY, van HEESWIJK e MERRICK, 1999; ARCONDÉGUY, LAWSON e MERRICK, 2000; LITTLE et al., 2000). A proteína GlnK forma um complexo tripartite com as proteínas NifA e NifL sob condições limitantes de nitrogênio (STIPS et al., 2004). Os autores sugeriram que este complexo reflete um estado de transição e que a ligação de GlnK com o complexo inibitório NifA-NifL resultaria na sua dissociação. Assim, em condições limitantes de nitrogênio e ausência de oxigênio, a interação com GlnK resultaria na dissociação do complexo NifA-NifL e NifL seria seqüestrada para a membrana, permitindo a ativação da transcrição dos genes *nif* por NifA. A adição de amônio resultaria na desuridililação de GlnK que, por sua vez, seria seqüestrada para a membrana celular de maneira dependente da proteína AmtB, como foi demonstrado em *E. coli* (COUTTS et al., 2002). O seqüestro de GlnK para a membrana poderia reduzir significativamente a dissociação do complexo NifA-NifL, proporcionando a formação do complexo inibitório (STIPS et al., 2004).

1.8.2.2 Controle da atividade de NifA por GlnK em *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii apresenta apenas uma proteína do tipo PII codificada pelo gene *glnK*, localizado em um operon juntamente com o gene *amtB* (MELETZUS et al., 1998). O operon *glnKamtB* de *A. vinelandii* é o único já descrito cuja expressão não depende dos níveis de nitrogênio (MELETZUS et al., 1998). A expressão do operon *nifLA* neste organismo também não é regulada por nitrogênio. Assim, o controle da atividade de NifA parece ser o principal mecanismo de regulação da expressão da nitrogenase. Diferentemente de *K. pneumoniae*, a atividade inibitória de NifL sobre NifA em *A. vinelandii* parece ser estimulada pela forma não uridililada da proteína GlnK, a qual interage com a proteína NifL (LITTLE et al., 2000). A uridililação de GlnK parece impedir a estimulação da atividade inibitória de NifL sobre NifA (RUDNICK et al., 2002).

1.8.2.3 Controle da atividade da proteína NifA em *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*

As bactérias *R. rubrum*, *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *H. seropedicae* não apresentam a proteína NifL, regulador negativo da atividade de NifA. Entretanto, a proteína NifA destes organismos tem sua atividade regulada em resposta aos níveis de amônio, provavelmente pela interação com proteínas do tipo PII.

Em *R. rubrum* a transcrição do gene *nifA* não é regulada, mas a atividade da proteína NifA é altamente controlada pelos níveis de amônio (ZHANG et al., 2000). Esta regulação provavelmente ocorre através da ligação direta entre NifA e a forma uridililada da proteína GlnB, a qual é necessária para a ativação de NifA sob condições limitantes de nitrogênio (ZHANG et al., 2000; ZHANG et al., 2001b; ZHANG et al., 2004).

Em *R. capsulatus* as proteínas GlnB e GlnK estão envolvidas na inibição da atividade da proteína NifA na presença de amônio, uma vez que a inibição pós-traducional desta proteína por íons amônio é eliminada no duplo mutante *glnBglnK* (DREPPER et al., 2003).

Em *A. brasilense* a proteína GlnB uridililada é necessária para a atividade da proteína NifA (de ZAMAROCZY, PAQUELIN e ELMERICH., 1993; ARAUJO et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que a proteína GlnB se liga diretamente à região N-terminal de NifA (CHEN et al., 2005).

Em *H. seropedicae* proteínas do tipo PII são necessárias para a atividade da proteína NifA quando esta é expressa em *E. coli* (MONTEIRO, 2001). As proteínas GlnB e GlnK interagem com o domínio N-terminal da proteína NifA *in vitro* (BENELLI et al., 2002b), sugerindo que GlnB e/ou GlnK são necessárias para a ativação de NifA neste organismo.

2 OBJETIVOS

A fixação biológica de nitrogênio é um processo ancestral, tendo surgido provavelmente antes da fotossíntese, necessário para a manutenção do ciclo do nitrogênio na Terra. Além disso, tem grande importância para a agricultura sustentável moderna. A possibilidade da utilização de *Herbaspirillum seropedicae* como biofertilizante tem aumentado o interesse por esta bactéria nos últimos anos. A compreensão detalhada do mecanismo de redução de N_2 e do transporte e metabolismo de compostos nitrogenados é essencial para realizar o potencial de utilização da fixação de nitrogênio. Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- Realizar a análise *in silico* da sequência de DNA dos genes *orf1* e *amtH* de *H. seropedicae*;
- Determinar a expressão do gene *amtH* de *H. seropedicae*;
- Mutagenizar os genes *orf1*, *glnK*, *amtB*, *glnB* e *amtH* de *H. seropedicae*;
- Determinar o efeito da mutação dos genes *orf1*, *glnK*, *amtB*, *glnB* e *amtH* sobre a atividade de nitrogenase de *H. seropedicae*;
- Determinar o efeito da mutação dos genes *orf1*, *glnK*, *amtB*, *glnB* e *amtH* sobre a atividade da glutamina sintetase em *H. seropedicae*;
- Determinar o efeito da mutação dos genes *amtB* e *amtH* sobre o transporte de metilamônio em *H. seropedicae*;
- Determinar o efeito da mutação do gene *amtB* sobre o desligamento da nitrogenase por adição de íons amônio em *H. seropedicae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Os microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpes/Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺	SOUZA et al., 2000
LNamtB	SmR1 contendo <i>amtB::Tc^R</i>	este trabalho
LNgnK	SmR1 contendo <i>glnK::sacB-Km^R</i>	este trabalho
LNgnKdel	SmR1 contendo deleção em fase de 192 nucleotídeos do gene <i>glnK</i>	este trabalho
LNamtH	SmR1 contendo <i>amtH::lacZ-Km^R</i>	este trabalho
LNamtBamtH	SmR1 contendo <i>amtB::Tc^R</i> e <i>amtH::lacZ-Km^R</i>	este trabalho
LNorf1del	SmR1 contendo deleção em fase de 279 nucleotídeos do gene <i>orf1</i>	este trabalho
LNgnB	SmR1 contendo <i>glnB::Tc^R</i>	este trabalho
LNamtBlacZ	SmR1 contendo <i>amtB::lacZ-Km^R</i>	este trabalho
LNgnKamtBlacZ	LNgnKdel contendo <i>amtB::lacZ-Km^R</i>	este trabalho
LNorf1amtBlacZ	LNorf1del contendo <i>amtB::lacZ-Km^R</i>	este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	Sm ^R ; F' [<i>proAB⁺ lacZΔM15</i>]	SAMBROOK et al., 1989
S17.1	Sm ^R Tra ⁺	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983

Plasmídeos

HS03-FP-00-000-056-G08	Contém um fragmento <i>Sma</i> I de aproximadamente 1,5 kb com a região 3' do gene <i>orf1</i> , o gene <i>glnK</i> completo e as regiões 5' e central do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pUC18	Programa Genopar (www.genopar.org)
HS03-FP-00-000-006-E09	Contém um fragmento de 1,6 kb com a região 5' terminal e a região a montante do gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> em pUC18	Programa Genopar (www.genopar.org)
HS06-FP-00-000-007-H07	Contém um fragmento <i>Sma</i> I de aproximadamente 1,6 kb com a parte central e a extremidade 3' do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i> em pUC18	Programa Genopar (www.genopar.org)
HSorf1glnKamtB	Contém um fragmento de aproximadamente 20 kb com o operon <i>orf1glnKamtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pLAFR3	Programa Genopar (www.genopar.org)
pACB194	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com a inserção do transposon EZ::TN TM <TET-1> (Epicentre) em pSUP202	BONATTO, A. C.
pACB210	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> e sua região promotora em pLAFR3.18	BONATTO, A. C.
pDK6	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> Km ^R	KLEINER, PAUL E MERRICK, 1988
pDK6nifACT	Contém as regiões promotora, central e 5'-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pDK6	este trabalho
pDK6pnifA	Contém a região promotora do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pDK6	este trabalho
pEMS140	Contém a fusão transcricional <i>nifB::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	REGO, 1997
pEMS301	Contém um fragmento <i>Eco</i> RI de 1,7 kb com a região promotora e parte do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	SOUZA et al., 1991b
pKOK6.1	Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , contém o cassete <i>lacZ</i> -Km ^R sem promotor	KOKOTEK e LOTZ, 1989
pLAFR3.18Cm	Cm ^R , Tc ^R , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R	NOINDORF et al., 2006
pLAFR3.18OGA	Contém um fragmento de 5,1 kb com o operon <i>orf1glnKamtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pLAFR3.18Cm	este trabalho
pLAFR3.18orf1	Contém um fragmento de 1,6 kb com o gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> e sua região promotora em pLAFR3.18Cm	este trabalho
pLAFR3.18nifACT	Contém as regiões promotora, central e 3'-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pLAFR3.18Cm	este trabalho

pLN3	Contém um fragmento <i>Bgl</i> II de 2,3 kb com o gene <i>amtB</i> e a extremidade 3' do gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	NOINDORF, 2002
pLN4	Contém um fragmento <i>Bgl</i> II de 2,7 kb com a extremidade 5' do gene <i>glnK</i> e o gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	NOINDORF, 2002
pLN4del	Contém um fragmento <i>Nru</i> I/ <i>Bgl</i> II de 1,7 kb com a extremidade 5' do gene <i>glnK</i> e o gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	este trabalho
pLN4delHinc	Contém um fragmento <i>Hinc</i> II/ <i>Bgl</i> II de 0,8 kb com as regiões central e 3' terminal do gene <i>orf1</i> e as regiões 5' terminal e central do gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	este trabalho
pLN6.1	Contém um fragmento de 1,6 kb com a região central e 3'- terminal do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedivae</i> em pTZ19R	NOINDORF, 2002
pLNamtBC	Contém um fragmento de 0,8 kb com a parte central do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ19R	este trabalho
pLNglnK	Contém um fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 0,9 kb com o gene <i>glnK</i> e extremidade 5' do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ18R	este trabalho
pMH1701	Km ^R , contém cassete <i>sacB</i> -Km ^R	HYNES et al., 1989
pMP220	Tc ^R , vetor de fusão transcricional <i>lacZ</i>	SPAINK et al., 1987
pMPamtH	Contém um fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Pst</i> I de 0,9 kb com a parte central do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pMPporf1	Contém a fusão <i>orf1::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i> em pMP220	este trabalho
pPW452	Tc ^R , derivado do pMP220 com o sítio de policlonagem invertido	P. WOODLEY
pPWamtBC	Contém um fragmento de 0,8 kb com a parte central do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	este trabalho
pPWpamtB	Contém um fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI de 1,5 kb com a região entre os genes <i>amtB</i> e <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	NOINDORF, 2002
pPWpglnK	Contém um fragmento <i>Hinc</i> II/ <i>Bgl</i> II de 0,8 kb com a região entre os genes <i>orf1</i> e <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	este trabalho
pRAM2T7	Contém as regiões central e 5' terminal do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pT7-7	MONTEIRO, 2001
pRAMM1	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e sua região promotora em pLAFR3.18	MONTEIRO, R. A.

pRW1	Contém a fusão <i>nifA::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	WASSEM et al., 2002
pSUP202	Cb ^R , Cm ^R , Tc ^R , Mob	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983
pSUPamtBC	Contém um fragmento de 0,8 kb com a parte central do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pSUP202	este trabalho
pSUPamtBClacZ	pSUPamtBC contendo um cassete <i>lacZ</i> -Km ^R inserido no sítio <i>Bam</i> HI do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pSUPamtBCTc	pSUPamtBC contendo o transposon EZ::TN TM <TET-1> (Epicentre) inserido no gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pSUPamtHC	Contém um fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 0,9 kb com a parte central do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pSUPamtHClacZ	pLNSUPamtC contendo um cassete <i>lacZ</i> -Km ^R inserido no sítio <i>Bam</i> HI do gene <i>amtH</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pSUPglnK	Contém um fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 0,9 pb com o gene <i>glnK</i> e extremidade 5' do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pSUP202	este trabalho
pSUPglnKdel	Contém um fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de aproximadamente 0,5 kb com o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> com uma deleção de 192 nucleotídeos em pSUP202	este trabalho
pSUPglnKdelSacB	pSUPglnKdel contendo um cassete <i>sacB</i> -Km ^R inserido no sítio <i>Bam</i> HI do vetor pSUP220	este trabalho
pSUPglnKsacB	pSUPglnK contendo um cassete <i>sacB</i> -Km ^R inserido no sítio <i>Bgl</i> II do gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>	este trabalho
pSUPorf1del	Contém a extremidade 5' do gene <i>glnK</i> e o gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> com uma deleção de 279 nucleotídeos em pSUP202	este trabalho
pSUPorf1delsacB	pSUPorf1del contendo um cassete <i>sacB</i> -Km ^R inserido no sítio <i>Bam</i> HI do plasmídeo pSUP202	este trabalho
pTZ18R	Cb ^R , <i>lacZ</i> , <i>f1</i>	MEAD, SZCZESNA-SKORUPA e KEMPER, 1986
pTZ19orf1del	Contém a extremidade 5' do gene <i>glnK</i> e o gene <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> com uma deleção de 279 nucleotídeos em pTZ19R	este trabalho
pTZ19R	Cb ^R , <i>lacZ</i> , <i>f1</i> , pTZ18R com sítio de policlonagem invertido	MEAD, SZCZESNA-SKORUPA e KEMPER, 1986
pUC18	Cb ^R , <i>lacZ</i>	INVITROGEN

pUC18glnKdel	Contém um fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I de aproximadamente 0,5 kb com o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> com uma deleção de 192 nucleotídeos em pUC18	este trabalho
pUCG08del	Contém um fragmento de aproximadamente 0,8 kb com a extremidade 3' do gene <i>orf1</i> , o gene <i>glnK</i> completo e a extremidade 5' do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pUC18	este trabalho

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (PEDROSA e YATES, 1984) a 30°C, sob agitação de 120 rpm. As culturas em meio sólido ou semi-sólido foram crescidas em NFb-malato sem agitação e incubadas em estufa a 30°C.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989) ou Terrific broth (TB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LA, a 37°C.

Para o preparo de células eletrocompetentes *E. coli* estirpe DH10B foi cultivada em meio SOB a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Após o choque elétrico, as células de *E. coli* foram mantidas em recuperação em meio SOC modificado a 37 °C, sob agitação.

3.2.1 Composição dos meios de cultura

O meio NFb-malato (PEDROSA e YATES, 1984) tem a seguinte composição:

	gramas/litro
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻¹
NaCl	1,0 . 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 . 10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6 . 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0 . 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,0 . 10 ⁻³

MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 . 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 . 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0 . 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,4 . 10 ⁻⁴

No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-malato 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄). Este meio foi denominado NFbHP-malato. Para a realização dos ensaios de transporte de amônio e metilamônio foram adicionados 5 mL/L de solução de fosfatos e o meio foi denominado NFbLP-malato.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl 2 mmol/L ou 20 mmol/L e glutamato de sódio 0,5 mmol/L, 4 mmol/L ou 5 mmol/L. As soluções de fosfatos, cloreto de amônio e glutamato de sódio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento do uso. O meio NFbHP-malato adicionado de 20 mmol/L de NH₄Cl foi denominado NFbHPN-malato.

Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos pela adição de ágar ao meio líquido nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L, respectivamente.

O meio TB (Terrific broth) (SAMBROOK et al., 1989) tem a seguinte composição:

Extrato de levedura	24,0 g/L
Triptona	12,0 g/L
Glicerol	4,0 mL/L
KH ₂ PO ₄	2,31 g/L
K ₂ HPO ₄	12,54 g/L

O meio LB (Luria Bertani) (SAMBROOK et al., 1989) tem a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio sólido foi obtido pela adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido, sendo denominado LA.

O meio SOB (SAMBROOK et al., 1989) tem a seguinte composição:

	gramas/litro
Bacto triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	0,5
Cloreto de potássio	0,186
Sulfato de magnésio	2,4

O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2 mol/L. O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 20 mmol/L ao meio SOB.

3.2.2 Antibióticos

As concentrações utilizadas de antibióticos estão listadas na tabela 2.

TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Abreviatura	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina	(Amp)	250 ^a
Tetraciclina	(Tc)	10 ^{a, b}
Canamicina	(Km)	100 ^a , 1000 ^b
Estreptomicina	(Sm)	80 ^{a, b}
Cloranfenicol	(Cm)	30 ^a 100 ^b

^a *Escherichia coli*

^b *Herbaspirillum seropedicae*

3.2.3 Manutenção de estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em suspensão em solução de glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *H. seropedicae* foram mantidas também em glicerol 50% a -20°C ou à temperatura ambiente em meio NFbHP-malato semi-sólido contendo 20

mmol/L de NH_4Cl .

3.3 PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE *H. seropedicae*

A purificação do DNA total de *H. seropedicae* foi feita segundo SOUZA (1990), com modificações. Cinquenta mililitros de cultura de *H. seropedicae* ($\text{D.O.}_{600} \cong 2,0$) crescida em meio NFbHP-malato adicionado de 20 mmol/L de NH_4Cl e dos antibióticos adequados foram centrifugados a $2.500 \times g$ por 10 minutos, a 4°C . As células foram lavadas com 30 mL do tampão TES (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0; EDTA 20 mmol/L, pH 8,0; NaCl 200 mmol/L) e ressuspensas em 20 mL do mesmo. As células foram incubadas com lisozima (100 $\mu\text{g/mL}$) a 30°C , durante 1 hora e lisadas pela adição do detergente SDS (1%) e incubação a 55°C por 10 minutos. A degradação das proteínas foi feita adicionando-se proteinase K (50 $\mu\text{g/mL}$) seguida de incubação a 50°C por 1 hora. A mistura foi extraída duas vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 100 μL de água estéril.

3.4 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala baseou-se no método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989), com modificações.

A bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foi crescida em 5 mL de meio LB adicionado dos antibióticos adequados até uma $\text{D.O.}_{600} \cong 2,0$. A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e as células foram coletadas por centrifugação ($13.000 \times g$, 1 minuto) e ressuspensas em 150 μL de uma solução contendo Tris.HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L (GET). A lise celular foi obtida com a adição de 200 μL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/V) (solução de lise). As proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 200 μL

de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas (13.000 x g, 5 minutos) e a solução aquosa foi extraída com 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 1mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 30 µL de água estéril. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de ágar.

3.5 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de ágar ou agarose horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC₃ System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CAUSA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer GraficUP860CE).

3.6 CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por SAMBROOK e colaboradores (1989).

Uma a cinco unidades das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA em um volume de 20 µL durante 4 horas na presença do tampão recomendado e temperatura adequada para a enzima.

3.7 PREPARO DOS VETORES

Os plasmídeos vetores foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por tratamento térmico, conforme instruções do fabricante, ou por extração com um volume de fenol-

clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA extraído foi precipitado com etanol absoluto, lavado, seco e dissolvido em água estéril (SAMBROOK et al., 1989).

3.8 LIGAÇÃO DE DNA

O vetor linearizado (item 3.7) foi ligado ao inserto numa razão molar de aproximadamente 1:5. Para a ligação foram adicionados tampão de ligação e 0,5 U de T4 DNA ligase e o sistema foi incubado a 16°C durante a noite. No caso de ligação de extremidades coesivas, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65 °C por 5 minutos e resfriada em gelo antes da adição do tampão e da enzima (SAMBROOK et al., 1989).

Quando os fragmentos a serem ligados possuíam pontas coesivas diferentes, as extremidades foram preenchidas por tratamentos com o fragmento Klenow da DNA polimerase I. As condições utilizadas para o tratamento do DNA foram aquelas especificadas pelo fabricante. Uma unidade da enzima foi utilizada para o reparo de 1 µg de DNA digerido com as enzimas de restrição adequadas. A reação foi feita em um volume final de 20 µL na presença do tampão recomendado e de 50 µmol/L de cada dNTP e incubada a 37 °C por 10 minutos.

3.9 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.9.1 Preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes

Dois e meio mililitros de uma cultura saturada de *E. coli* foram inoculados em 250 mL de meio SOB. A cultura foi crescida até D.O.₆₀₀ de $\cong 0,5$. As células foram coletadas por centrifugação (2.500 x g por 5 minutos, a 4°C) e lavadas duas vezes com água estéril (4 °C). Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 15% (4 °C), centrifugadas novamente (2.500 x g por 5 minutos, a 4 °C), ressuspensas em um volume final de 0,5 mL de glicerol 15% (4 °C), alíquotadas em tubos (30 µL) e armazenadas a -70 °C. As células foram mantidas sob refrigeração constante durante todo o procedimento (baseado em DOWER et al., 1988; HANAHAN, 1983).

3.9.2 Preparo de células de *H. seropedicae* eletrocompetentes

Quarenta microlitros de uma cultura de *H. seropedicae* D.O.₆₀₀ \cong 2,0 foram inoculados em 40 mL de meio NFbHPN-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl. A cultura foi crescida até D.O.₆₀₀ de 1,0-1,5. As células foram coletadas por centrifugação (2.500 x g por 5 minutos) e lavadas uma vez com água estéril (4 °C). Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 15% (4 °C), centrifugadas novamente (2.500 x g por 5 minutos), ressuspensas em um volume final de 150µL de glicerol 15% (4 °C), alíquotadas em tubos (30 µL) e armazenadas a -70°C.

3.9.3 Transformação bacteriana

O método utilizado foi indicado pelo fabricante do eletroporador (GIBCO-BRL).

Meio a três microlitros (5 ng - 0,5 µg) da solução de DNA a ser eletroporado foram adicionados em 30 µL de células eletrocompetentes. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) para induzir a entrada do DNA na bactéria.

Após o choque elétrico, as células de *E. coli* foram transferidas para 1mL do meio SOC e mantidas em recuperação a 37°C, sob agitação, por uma hora. A suspensão de bactérias foi plaqueada em meio sólido LA contendo os antibióticos adequados. As células de *H. seropedicae* foram recuperadas em 1 mL de meio NFbHP-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl a 30°C, sob agitação, por 8 horas. A suspensão de bactérias foi plaqueada em meio sólido NFbHPN-malato na presença dos antibióticos adequados.

3.10 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente, na

ausência de antibióticos, até uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Em seguida, foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* e as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30 °C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-malato e plaqueada em meio NFbHP-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl e contendo os antibióticos adequados.

3.11 SEQUENCIAMENTO DE DNA

3.11.1 Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento

A purificação de DNA plasmidial para posterior sequenciamento foi realizada basicamente como no item 3.4. Depois de dissolvido em água, o DNA foi incubado com RNase (concentração final de 10 µg/mL) por 3 horas a 37°C. Foram feitas uma extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e uma extração com clorofórmio, o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado, seco e dissolvido em aproximadamente 10 µL de água estéril.

3.11.2 Reação de sequenciamento

O procedimento foi baseado na incorporação de dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). Nesta reação foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA purificado, 2 pmols do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 3,0 µL de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O volume final da reação foi de 8 µL. A reação foi feita utilizando-se um termociclador e os parâmetros foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C e 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C e 1,5 minutos a 60°C.

3.11.3 Tratamento da amostra após reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com 2 volumes de isopropanol, lavado com etanol 80%, dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.12 CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES TRANSCRICIONAIS *orf1::lacZ* E *glnK::lacZ*

Para a construção do plasmídeo pMPporf1 (*orf1::lacZ*) um fragmento *KpnI/PstI* de 1,6 kb do plasmídeo HS03-FP-00-000-006-E09 foi subclonado no vetor pMP220. Este fragmento contém 0,5 kb da extremidade 5' da região codificadora e 1,2 kb da região a montante de *orf1* (figura 4).

Para a construção do plasmídeo pPWpglnK (*glnK::lacZ*), o plasmídeo pLN4 foi digerido com a enzima *HincII* e religado, originando o plasmídeo pLN4delHincII. Este plasmídeo foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e um fragmento de 0,8 kb, contendo a região entre os genes *orf1* e *glnK* (0,5 kb da região montante do gene *glnK* e 0,3 kb da região codificadora), foi subclonado no plasmídeo pPW452, originando o plasmídeo pPWpglnK (figura 5).

3.13 CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *amtB* DE *H. seropedicae*

3.13.1 Construção do plasmídeo pSUPamtBCTc

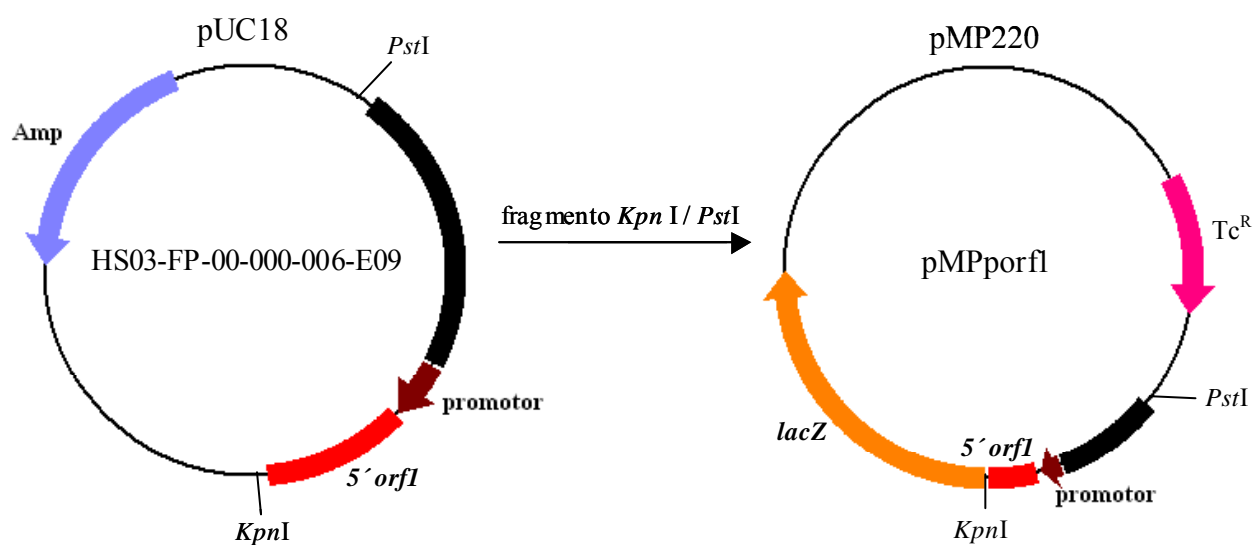
O inserto do plasmídeo pLN3 foi submetido à deleção unidirecional com a enzima exonuclease III, originando o plasmídeo pLN6.1, que não possui os 614 nucleotídeos da extremidade 5' do gene *amtB* de *H. seropedicae* (NOINDORF, 2002). Este plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *EcoRV*. O sítio para a enzima *EcoRV* localiza-se a 33 nucleotídeos da extremidade 3' do gene *amtB*. O fragmento isolado, contendo a região central deste gene foi subclonado no vetor pTZ19R nos sítios *EcoRI* e *HincII*, originando o plasmídeo pLNaamtBC (figura 6). A

região central do gene *amtB* foi isolada do plasmídeo pLNamtBC com as enzimas *EcoRI/PstI* e subclonado no vetor pPW452 nos mesmos sítios, originando o plasmídeo pPWamtBC (figura 6). Este plasmídeo foi digerido com as enzimas *SphI/BglII* e o fragmento de 0,8 kb isolado, contendo a região central do gene *amtB*, foi subclonado no vetor pSUP202 nos sítios *SphI/BamHI*, originando o plasmídeo pSUPamtBC (figura 6). Um transposon que confere resistência ao antibiótico tetraciclina, foi inserido no plasmídeo pSUPamtBC. A inserção foi feita utilizando-se o kit EZ::TNTM<TET-1>Insertion Kit, Epicentre, conforme instruções do fabricante. Sete plasmídeos recombinantes foram obtidos. A seleção daqueles em que a inserção ocorreu dentro do gene *amtB* foi feita por digestão destes plasmídeos com as enzimas de restrição *HindIII* e *SalI*. Apenas um plasmídeo foi selecionado. Este plasmídeo foi denominado pSUPamtBCTc (figura 6). A localização exata do cassete Tc^R no gene *amtB* foi determinada por sequenciamento com o oligonucleotídeo iniciador “TET-1 RP-1 reverse primer” (Epicentre).

3.13.2 Obtenção da estirpe mutante *amtB*::Tc^R de *H. seropedicae*

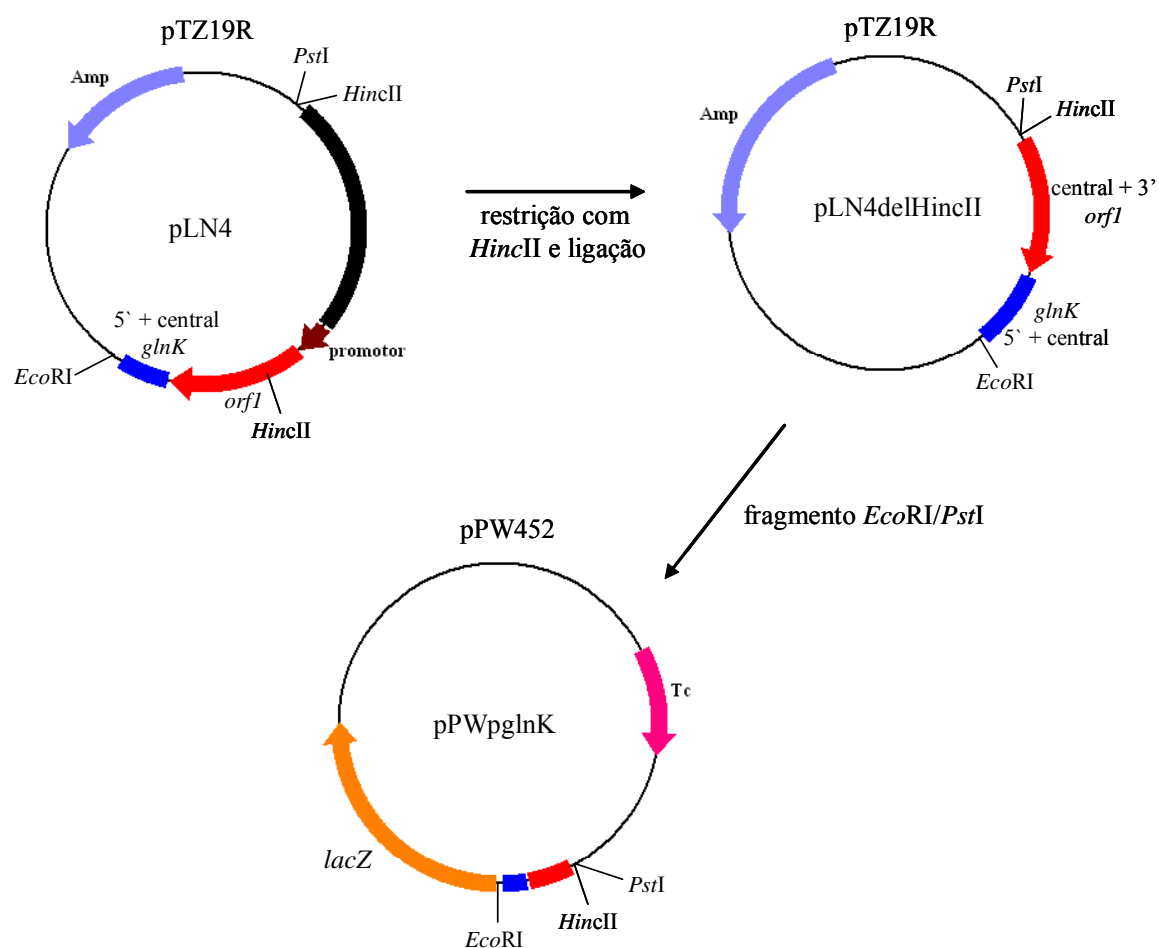
O plasmídeo recombinante pSUPamtBCTc, que possui o transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre) inserido no gene *amtB*, foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante obtido foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1. As colônias de células contendo inserções do transposon resultante de recombinação homóloga dupla foram identificadas por resistência à tetraciclina (10 µg/mL) e sensibilidade ao cloranfenicol (100 µg/mL). Uma estirpe denominada LNamtB foi selecionada para caracterização posterior.

FIGURA 4 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMPporf1



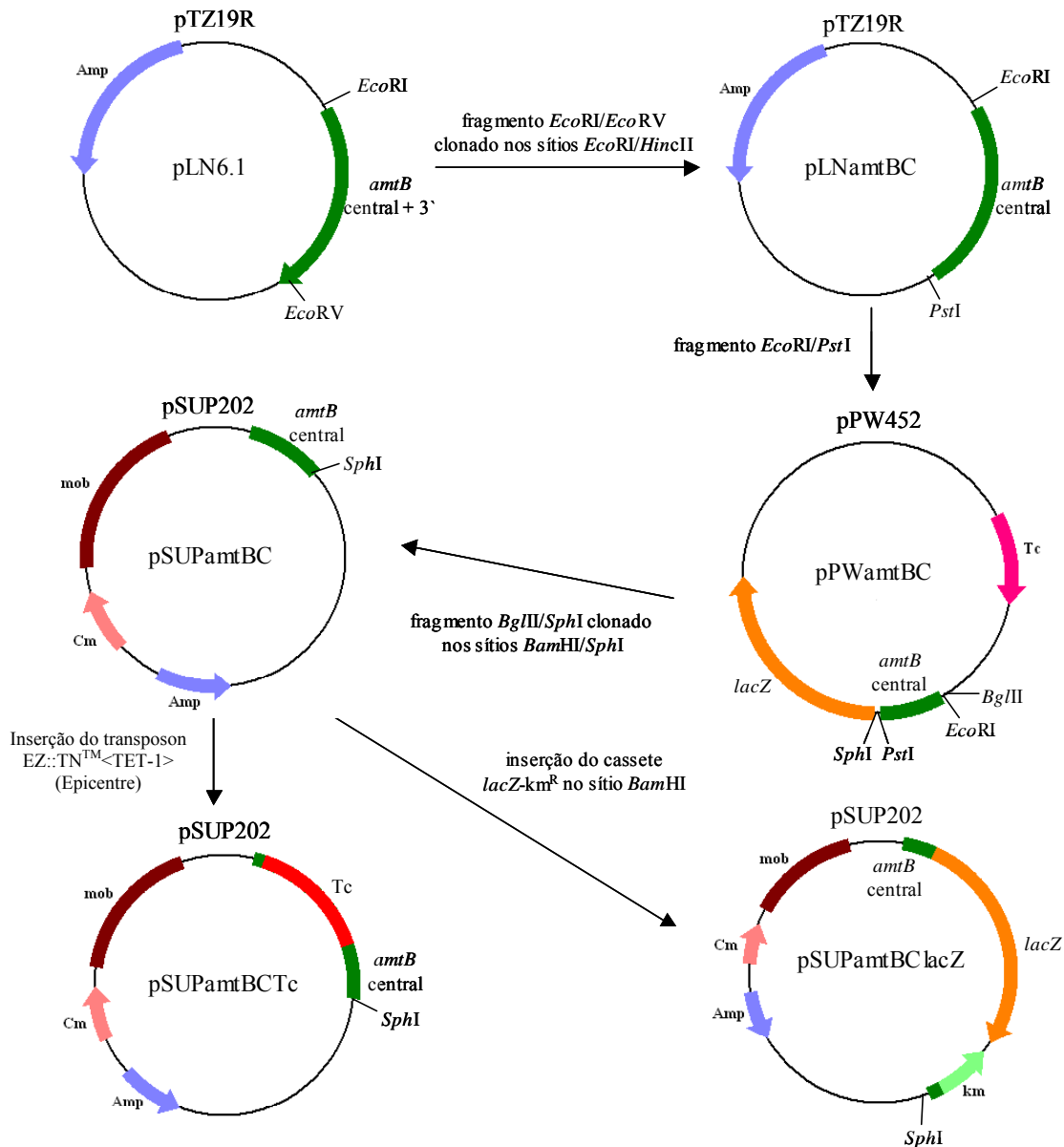
Um fragmento *PstI/KpnI* de 1,6 kb contendo a região promotora e a extremidade 5' do gene *orf1* foi isolado do plasmídeo HS03-FP-00-000-006-E09 e ligado ao vetor pMP220 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pMPporf1.

FIGURA 5 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pPWpglnK



O plasmídeo pLN4 foi digerido com a enzima de restrição *HincII* e religado, originando o plasmídeo pLN4delHincII. Um fragmento *EcoRI/PstI* contendo as regiões central e 3' terminal do gene *orfI* e as regiões 5' e central do gene *glnK* foi isolado do plasmídeo pLN4delHincII e ligado ao vetor pPW452 digerido com as mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo pPWpglnK.

FIGURA 6 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pSUPamtBCTc E pSUPamtBClacZ



Um fragmento *EcoRI/EcoRV* foi isolado do plasmídeo pLN6.1 e ligado ao vetor pTZ19R nos sítios *EcoRI/HincII*, originando o plasmídeo pLNamtBC. A região central do gene *amtB* foi isolada do plasmídeo pLNamtBC com as enzimas *EcoRI/PstI* e subclonada no vetor pPW452 nos mesmos sítios, originando o plasmídeo pPWamtBC. Este foi digerido com as enzimas *SphI/BglII* e o fragmento isolado, contendo a região central do gene *amtB*, foi subclonado no vetor pSUP202 nos sítios *SphI/BamHI*, originando o plasmídeo pSUPamtBC. O transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre) e um cassete lacZ-Km^R foram inseridos no plasmídeo pSUPamtBC, originando os plasmídeos pSUPamtBCTc e pSUPamtBClacZ, respectivamente.

3.14 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *amtH* DE *H. seropedicae*

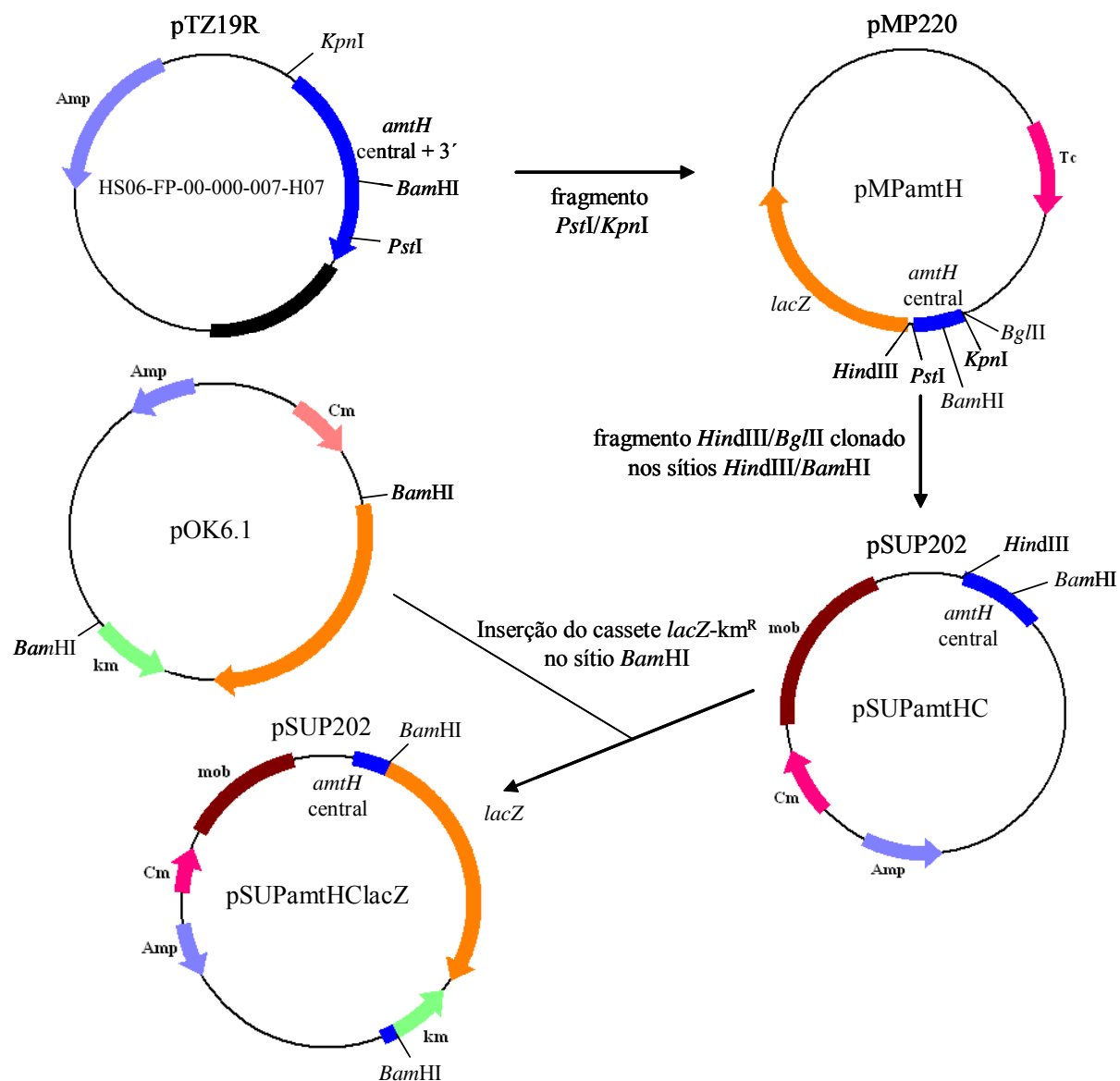
3.14.1 Construção do plasmídeo pSUPamtHClacZ

Um fragmento *Pst*I/*Kpn*I contendo a parte central do gene *amtH* de *H. seropedicae* foi isolado do plasmídeo HS06-FP-00-000-007-H07 (Programa Genopar – www.genopar.org) e subclonado no vetor pMP220 nos mesmos sítios, originando o plasmídeo pMPamtH (figura 7). A mesma região de DNA foi isolada do plasmídeo pMPamtH por restrição utilizando os sítios para as enzimas *Hind*III e *Bgl*II, localizados no sítio de policlonagem do vetor pMP220. Esta região foi subclonada nos sítios *Bam*HI e *Hind*III do vetor pSUP202, originando o plasmídeo pSUPamtHC (figura 7). Este último foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, que possui um único sítio de reconhecimento dentro do gene *amtH*, e ligado a um cassete *lacZ*-Km^R isolado do plasmídeo pKOK6.1 por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. O plasmídeo resultante foi denominado pSUPamtHClacZ (figura 7).

3.14.2 Obtenção da estirpe mutante *amtH::lacZ* de *H. seropedicae*

O plasmídeo pSUPamtHClacZ que possui o gene *lacZ* e o gene de resistência a canamicina inserido no gene *amtH* foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante S17.1 pSUPamtHClacZ foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1. Colônias contendo inserção do genoma foram selecionadas por crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL) e canamicina (1000 µg/mL). As estirpes mutantes resultantes de recombinação homóloga dupla foram identificadas pela sensibilidade ao cloranfenicol (100 µg/mL). A estirpe mutante *amtH::lacZ*-Km^R de *H. seropedicae* foi denominado LNamtH.

FIGURA 7 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPamTHClacZ



Um fragmento *PstI/KpnI* contendo a região central do gene *amtH* foi isolado do plasmídeo HS06-FP-00-000-007-H07 e ligado ao vetor pMP220 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pMPamTH. A mesma região de DNA foi isolada do plasmídeo pMPamTH por restrição com as enzimas *HindIII* e *BglII*. Esta região foi subclonada nos sítios *BamHI* e *HindIII* do vetor pSUP202, originando o plasmídeo pSUPamTHC. Este último foi digerido com a enzima de restrição *BamHI*, que possui um único sítio de reconhecimento dentro do gene *amtH*, e ligado a um cassete *lacZ-Km^R* isolado do plasmídeo pKOK6.1. O plasmídeo resultante foi denominado pSUPamTHClacZ.

3.15 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *amtBamtH* DE *H. seropedicae*

O plasmídeo pSUPamtBCTc, que possui o transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre) inserido no gene *amtB* foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante S17.1pSUPamtBCTc foi utilizado como doador em experimentos de conjugação com *H. seropedicae* estirpe L^{NamtH} (*amtH*::*lacZ*-Km^R) para construção da estirpe duplo mutante *amtB*::Tc^R/*amtH*::*lacZ*-Km^R. Colônias contendo a inserção do transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre) no gene *amtB* foram selecionadas pelo crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL), canamicina (200 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL). As estirpes mutantes resultantes de recombinação homóloga dupla foram identificadas pela sensibilidade ao cloranfenicol (100 µg/mL). A estirpe mutante *amtB*::Tc^R/*amtH*::*lacZ*-Km^R foi denominada L^{NamtBamtH}.

3.16 CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES *glnK* DE *H. seropedicae*

3.16.1 Construção do mutante *glnK*::*sacB* de *H. seropedicae*

O mutante *glnK*::*sacB* de *H. seropedicae* foi obtido pela inserção de um cassete *sacB*-Km^R, contendo o gene *sacB* e um gene de resistência a canamicina, no gene *glnK* da estirpe selvagem SmR1. A inserção do cassete no genoma de *H. seropedicae* SmR1 ocorreu através da recombinação dupla com o plasmídeo suicida pSUPglnKsacB que contém o gene *glnK* mutado (item 3.15.1.2).

3.16.1.1 Amplificação por PCR do fragmento que contém o gene *glnK* de *H. seropedicae*

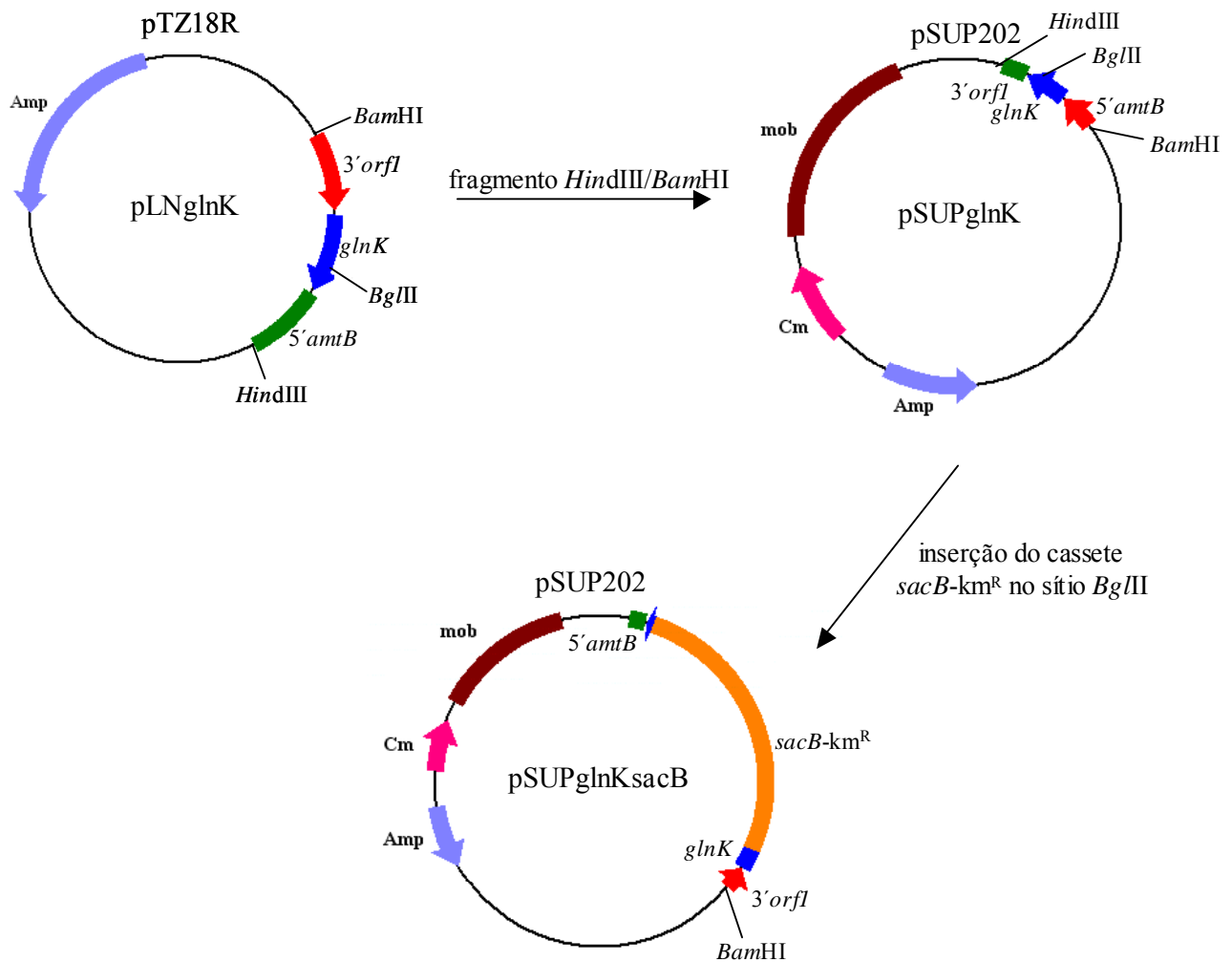
A amplificação do fragmento que contém o gene *glnK* de *H. seropedicae* foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação de PCR

foram planejados a partir das seqüências dos genes *glnK* e *amtB* de *H. seropedicae* (NOINDORF, 2002). Sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III foram introduzidos nestes oligonucleotídeos que foram denominados *glnKD* (5'-GACTGAAAGGATCCGCGTGTCC-3') e *glnKR* (5'-CGAGGGCAAAGCTTCTTCGGTGG-3'). Como molde para a reação foi utilizado o DNA genômico de *H. seropedicae*. A reação de amplificação foi feita em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) utilizando tampão de PCR (20mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50mmol/L KCl), 0,2 mmol/L de dNTPs, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 1-10 ng de DNA purificado (molde), 0,2 pmol/L de cada oligonucleotídeo e 1U da enzima Taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 50 µL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 2 minutos a 72°C e 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. O fragmento amplificado foi analisado em gel horizontal de ágar 1,0% e posteriormente clonado no vetor pTZ18R nos sítios *Bam*HI e *Hind*III. A seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita em meio LA contendo X-gal e ampicilina. A análise do plasmídeo recombinante, denominado pLN*glnK*, foi realizada por meio de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. A presença do gene *glnK* no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento.

3.16.1.2 Construção do plasmídeo pSUP*glnK*sacB

Um fragmento *Bam*HI/*Hind*III que contém o gene *glnK* de *H. seropedicae* foi isolado do plasmídeo pLN*glnK* (item 3.15.1.1) e subclonado no vetor pSUP202 nos mesmos sítios de restrição, originando o plasmídeo pSUP*glnK* (figura 8). Este último foi digerido com a enzima de restrição *Bgl*II, que possui um único sítio de reconhecimento dentro do gene *glnK*, e ligado a um cassete *sacB*-Km^R isolado do plasmídeo pMH1701 por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. O plasmídeo resultante foi denominado pSUP*glnK*sacB (figura 8).

FIGURA 8 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPglnKsacB



Um fragmento *BamHI/HindIII* que contém o gene *glnK* de *H. seropedicae* foi isolado do plasmídeo pLNglnK e subclonado no vetor pSUP202 nos mesmos sítios de restrição, originando o plasmídeo pSUPglnK. Este último foi digerido com a enzima de restrição *BglII*, que possui um único sítio de reconhecimento dentro do gene *glnK*, e ligado a um cassete *sacB-Km^R* isolado do plasmídeo pMH1701 por digestão com a enzima de restrição *BamHI*. O plasmídeo resultante foi denominado pSUPglnKsacB.

3.16.1.3 Obtenção do mutante *glnK::sacB* de *H. seropedicae*

O plasmídeo pSUPglnKsacB foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1 e as estirpes contendo inserção no cromossoma foram selecionadas por crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina e canamicina. As estirpes mutantes resultantes de recombinação homóloga dupla foram selecionadas por sensibilidade ao antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL). A estirpe mutante selecionada foi denominada LN_{glnK}.

3.16.2 Construção da estirpe mutante *glnKdel* de *H. seropedicae*

3.16.2.1 Construção do plasmídeo pSUPglnKdel

Para a construção do plasmídeo pSUPglnKdel, o clone HS03-FP-00-000-056-G08 da biblioteca genômica de *H. seropedicae* (Programa Genopar), que contém a região 3' do gene *orf1*, o gene *glnK* e as regiões 5' e central do gene *amtB*, foi digerido com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI*, tratado com a enzima Klenow e dNTP's e novamente religado (figura 9). O plasmídeo obtido, denominado pUCG08del, foi utilizado como molde para reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos GlnKdelD e M13reverso e GlnKdelR e M13universal. A sequência dos oligonucleotídeos GlnKdelR e GlnKdelD, representada abaixo, foi baseada na sequência do operon *orf1glnKamtB*. Sítios para a enzima de restrição *XhoI* foram introduzidos nestes oligonucleotídeos:

XhoI

GlnKdelD 5' GGACCTGCTCGAGGTGATCCGT 3'

XhoI

GlnKdelR 5' AAGCCCTCGAGTTCAGTCACGGT 3'

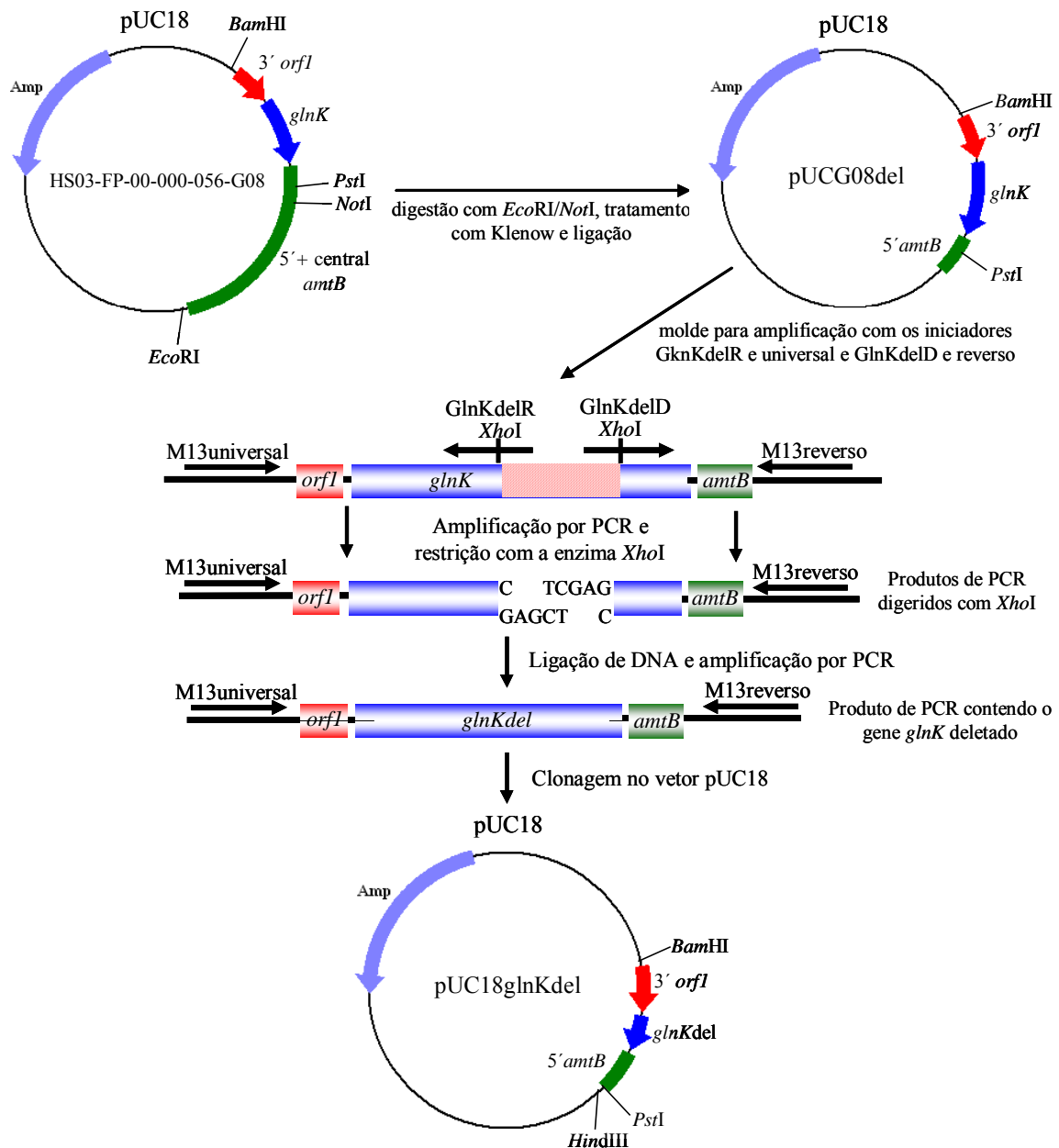
As reações de amplificação foram feitas em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) utilizando-se o tampão de PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl) , 0,2 mmol/L de dNTPs, 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio, 1-10 ng de DNA purificado (molde), 0,4 pmol/μL dos oligonucleotídeos M13universal, M13reverso ou GlnKdelR ou 0,8 pmol/μL do oligonucleotídeo GlnKdelD e 0,8 μL da enzima Taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 25 μL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C (GlnKdelR-M13universal) ou 57°C (GlnKdelD-M13reverso) e 2 minutos a 72°C e 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel horizontal de agarose 1,2%. Foram obtidos dois fragmentos de PCR, GlnKdelR-M13universal e GlnKdelD-M13reverso, que foram digeridos com a enzima de restrição *XhoI* e ligados, produzindo um fragmento cotendo o gene *glnK* com deleção de 192 pb. O produto de ligação foi utilizado como molde para uma reação de PCR com os oligonucleotídeos M13universal e M13reverso. A reação de amplificação foi feita em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 utilizando-se o tampão de PCR (20mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50mmol/L KCl), 0,2 mmol/L de dNTPs, 1-10 ng da ligação (molde), 0,4 pmol/μL de cada oligonucleotídeos e 0,8 μL da enzima Taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 25 μL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C e 2 minutos a 72°C e 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. O fragmento amplificado foi analisado em gel horizontal de agarose 1,2% e posteriormente clonado no vetor pUC18 nos sítios *Bam*HI e *Pst*I (figura 9). A seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita em meio LA contendo X-gal e ampicilina. A análise do plasmídeo recombinante, denominado pUC18glnKdel, foi realizada por meio de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I. A presença da deleção em fase do gene *glnK* no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento com os oligonucleotídeos M13universal e M13reverso. Um fragmento

*Bam*HI/*Hind*III que contém o gene *glnK* deletado foi isolado do plasmídeo pUC18*glnKdel* e subclonado no vetor pSUP202 nos mesmos sítios de restrição, originando o plasmídeo pSUP*glnKdel* (figura 10). Para a construção do plasmídeo pSUP*glnKdelsacB* um cassete *sacB*-Km^R, isolado do plasmídeo pMH1701 por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, foi inserido no plasmídeo pSUP*glnKdel* neste mesmo sítio de restrição (figura 10).

3.16.2.2 Obtenção da estirpe mutante *glnKdel* de *H. seropedicae*

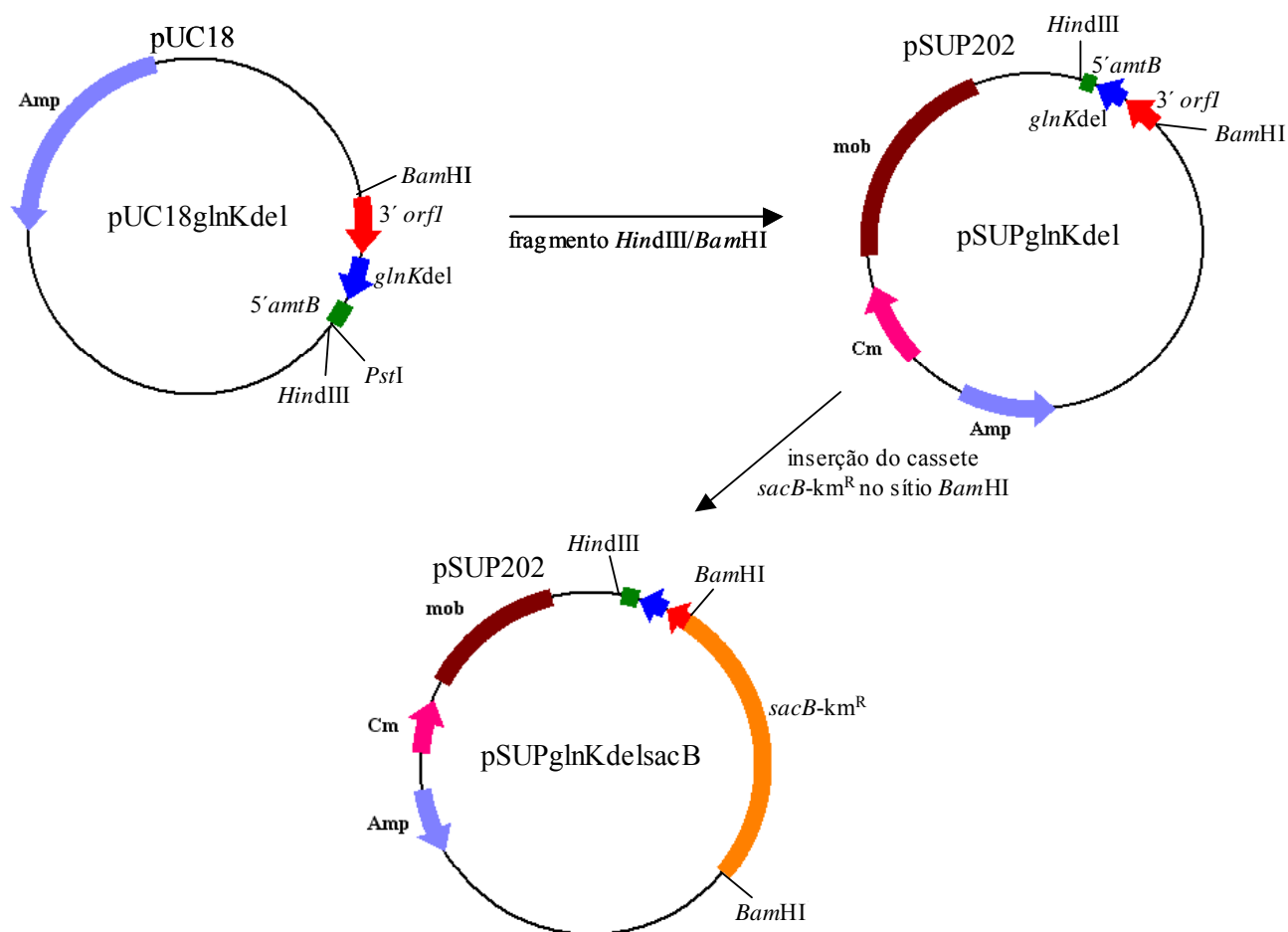
O plasmídeo pSUP*glnKdelsacB* foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1. As estirpes mutantes resultantes de recombinação simples foram selecionadas por crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina, canamicina e cloranfenicol. Uma das estirpes mutantes obtidas foi crescida durante a noite em meio NFbHPN-malato líquido com o antibiótico estreptomicina. Um microlitro da cultura foi plaqueado em meio NFbHPN-malato contendo 5% de sacarose e o antibiótico estreptomicina. As colônias obtidas foram testadas quanto à sensibilidade aos antibióticos canamicina e cloranfenicol e posteriormente analisadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos *GlnKF1* (5' TGTCCAAGACCTTCGACG 3') e *GlnKR1* (5' CATGCTCATTAGAGTTCC 3'). As reações de amplificação foram feitas em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) utilizando-se o tampão de PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), 0,2 mmol/L de dNTPs, 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio, 1-10 ng de DNA purificado (molde), 0,2 pmol/μL de cada oligonucleotídeos e 1 μL da enzima Taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 20 μL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50 °C e 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel horizontal de agarose 2%. A estirpe mutante construída foi denominada LN*glnKdel*.

FIGURA 9 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pUC18glnKdel



Para a construção do plasmídeo pUC18glnKdel, o clone HS03-FP-00-000-056-G08 foi digerido com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI*, tratado com a enzima Klenow e novamente religado, originando plasmídeo pUCG08del. Este foi utilizado como molde para reações de PCR com os oligonucleotídeos GlnKdelD e reverso e GlnKdelR e universal. Os fragmentos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *XhoI* e ligados entre si. A ligação foi utilizada como molde para uma reação de PCR com os oligonucleotídeos universal e reverso. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pUC18 nos sítios *BamHI* e *PstI*, originando o plasmídeo pUC18glnKdel.

FIGURA 10 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPglnKdelsacB



O fragmento *BamHI/HindIII* que contém o gene *glnK* deletado foi isolado do plasmídeo pUC18glnKdel e subclonado no vetor pSUP202 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pSUPglnKdel. Para a construção do plasmídeo pSUPglnKdelsacB um cassete *sacB-Km^R*, isolado do plasmídeo pMH1701 por digestão com a enzima de restrição *BamHI*, foi clonado no plasmídeo pSUPglnKdel.

3.17 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *orf1del* DE *H. seropedicae*

3.17.1 Construção do plasmídeo pSUPorf1delsacB

Para a construção do plasmídeo pSUPorf1del o plasmídeo pLN4, que possui o gene *orf1* e a extremidade 5' do gene *glnK* de *H. seropedicae* (NOINDORF, 2002), foi digerido com as enzimas de restrição *NruI* e *XbaI*, tratado com Klenow e dNTP's e religado, originando o plasmídeo pLN4del (figura 11). Para a deleção em fase de 279 pb do gene *orf1*, o plasmídeo pLN4del foi digerido com a enzima de restrição *NarI* e religado, originando o plasmídeo pTZ19orf1del (figura 11). Este plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *SmaI* e *HindIII* e o fragmento de DNA que contém o gene *orf1* deletado e a extremidade 5' do gene *glnK* foi subclonado no plasmídeo pSUP220 nos sítios *EcoRV* e *HindIII*, originando o plasmídeo pSUPorf1del. Este plasmídeo foi digerido com a enzima *BamHI* para a inserção de um cassete *sacB-Km^R*, obtido do plasmídeo pMH1701 por digestão com esta mesma enzima. O plasmídeo resultante foi denominado pSUPorf1delsacB (figura 11).

3.17.2 Obtenção da estirpe mutante *orf1del* de *H. seropedicae*

A obtenção da estirpe mutante *orf1del* de *H. seropedicae* foi feita como descrito no item 3.16.2.2. As colônias que cresceram em sacarose 5% e que apresentavam sensibilidade aos antibióticos canamicina e cloranfenicol foram analisadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos orf1F (5' ACCAGATAATGAGTTCAGC 3') e orf1R (5' TCTTCCAGTCGGTGTAGC 3'). As reações de amplificação foram feitas em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) utilizando-se o tampão de PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), 0,2 mmol/L de dNTPs, 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio, 1-10 ng de DNA genômico purificado (molde), 0,2 pmol/μL de cada oligonucleotídeos e 1 μL da enzima Taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 20 μL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 15

segundos a 95°C, 30 segundos a 50 °C e 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel horizontal de agarose 2%. A estirpe mutante selecionada foi denominada LNorfl del.

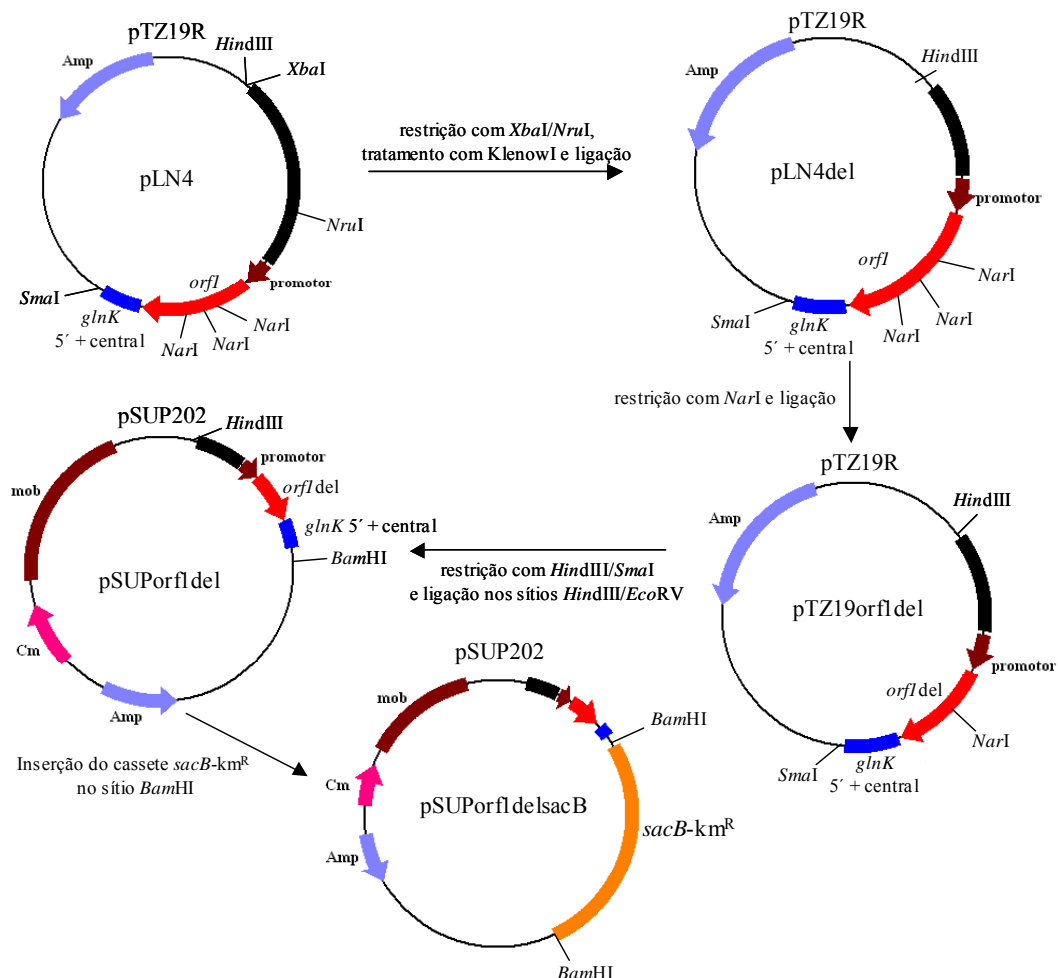
3.18 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *glnB* DE *H. seropedicae*

Para a construção da estirpe mutante *glnB* de *H. seropedicae*, o plasmídeo pACB194 (BONATTO, A C., não publicado) que contém o transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre) inserido no gene *glnB* deste organismo, foi introduzido em *E. coli* estirpe S17.1. O transformante obtido foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1. Colônias contendo inserção do transposon no genoma foram selecionadas pelo crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL). As estirpes mutantes resultantes de recombinação homóloga dupla foram identificadas pela sensibilidade ao cloranfenicol (100 µg/mL). A estirpe mutante selecionada foi denominada LNglnB.

3.19 CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES CROMOSSOMAIS *amtB::lacZ* DE *H. seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* contendo fusões cromossomais *amtB::lacZ* foram obtidas pela inserção de um cassete *lacZ*-Km^R, contendo o gene *lacZ* sem promotor e um gene de resistência a canamicina, no gene *amtB* do cromossoma das estirpes SmR1, LNglnKdel e LNorfl del, originando as estirpes LNaamtBlacZ, LNglnKamtBlacZ e LNorflamtBlacZ, respectivamente. A inserção do cassete ocorreu através da recombinação simples com o plasmídeo suicida pSUPamtBClacZ contendo o gene *amtB* mutado, construído como descrito abaixo.

FIGURA 11 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPorf1delsacB



Para a construção do plasmídeo pSUPorf1del o plasmídeo pLN4, que possui o gene *orf1* completo e a extremidade 5' do gene *glnK*, foi digerido com as enzimas de restrição *NruI* e *XbaI*, tratado com Klenow e dNTP's e religado, originando o plasmídeo pLN4del. Para a deleção em fase de 279 pb do gene *orf1*, o plasmídeo pLN4del foi digerido com a enzima de restrição *NarI* e religado, originando o plasmídeo pTZ19orf1del. Este plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *SmaI* e *HindIII* e o fragmento de DNA que contém o gene *orf1* deletado e a extremidade 5' do gene *glnK* foi subclonado no plasmídeo pSUP202 nos sítios *EcoRV* e *HindIII*, originando o plasmídeo pSUPorf1del. Um cassete *sacB-Km^R* foi inserido no sítio *BamHI* do plasmídeo pSUPorf1del, originando o plasmídeo pSUPorf1delsacB.

3.19.1 Construção do plasmídeo pSUPamtBClacZ

Para a construção do plasmídeo pSUPamtBClacZ, um cassete *lacZ*-Km^R, isolado do plasmídeo pKOK6.1 por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, foi inserido no sítio *Bam*HI do gene *amtB* clonado no plasmídeo pSUPamtBC (figura 6).

3.19.2 Obtenção da fusão cromossomal *amtB*::*lacZ* de *H. seropedicae*

O plasmídeo pSUPamtBClacZ foi introduzido por conjugação nas diferentes estirpes de *H. seropedicae*. As colônias transformantes foram selecionadas por crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina e canamicina.

3.20 HIBRIDIZAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

3.20.1 Transferência do DNA do gel de agarose para membrana de náilon

O DNA cromossomal das diferentes estirpes de *H. seropedicae* foi purificado e digerido com enzimas de restrição adequadas. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose, visualizados, fotografados e transferidos por capilaridade para membranas de náilon (Hibond-N+, Amersham Biosciences), segundo recomendação do fabricante da membrana. Antes da transferência, o gel foi tratado com HCl 0,25 mol/L por 5 minutos, solução desnaturante (1,5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L NaOH) por 20 minutos e solução neutralizante (1,5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L Tris-Cl pH 7,2) por 20 minutos. Após secagem ao ar, o DNA foi fixado à membrana por irradiação com luz ultravioleta em transiluminador durante 4 minutos.

3.20.2 Preparo da sonda

Os plasmídeos a serem utilizados como sonda foram digeridos com enzimas de restrições adequadas. Os fragmentos de DNA foram marcados com $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham Biosciences, 3.000 Ci/mmol) utilizando o sistema “Megaprimer DNA Labeling” (Amersham Biosciences) conforme recomendação do fabricante.

3.20.3 Hibridização

As membranas contendo DNA genômico de *H. seropedicae* foram pré-hibridizadas em tampão fosfato 0,5 mol/L, pH 8,0 contendo 2% de SDS, a 65 °C, por 24 horas e hibridizadas na mesma solução. Para a hibridização, a sonda marcada com $[^{32}\text{P}]$ foi desnaturada em banho fervente e adicionada ao sistema, que foi incubado a 65°C durante aproximadamente 24 horas. Após incubação, as membranas foram lavadas com SSC 2X (0,3 mol/L NaCl e 0,03 mol/L de citrato de sódio) contendo 0,1% de SDS a 65°C por 15 minutos, e com SSC 0,1X (0,015 mol/L NaCl e 0,0015 mol/L de citrato de sódio) contendo 0,1% de SDS a 65°C por mais 15 minutos e expostas a filme de raios-X.

3.21 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE METILAMÔNIO

Para a realização dos experimentos de transporte de metilamônio, as estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em frascos de 25 mL contendo 5 mL de meio NFbLP-malato líquido suplementado com 2 mmol/L de NH_4Cl por 16 horas a 30⁰ C, sob agitação. Após este período foram adicionados às culturas 10 $\mu\text{mol/L}$ de $[^{14}\text{C}]$ -metilamônio (atividade específica de 54,6 mCi/mmol). Aliquotas de 50 μL foram coletadas em diferentes tempos e filtradas em membrana de náilon (Hybond N⁺, Amersham Biosciences), utilizando o sistema de transferência Slot Blot (Gibco BRL). A radioatividade incorporada nas células foi detectada utilizando um Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics).

3.22 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE AMÔNIO

Para a realização dos experimentos de transporte de amônio, as estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio NFbLP-malato líquido suplementado com 20 mmol/L de NH_4C a 30 °C e 120 rpm. As culturas de células foram diluídas 200 vezes em meio NFbLP-malato sem adição de nitrogênio (50 μL de células em 10 mL de meio) e incubadas a 30 °C e 120 rpm por 4 horas. Após este período, 0,1 mmol/L de NH_4Cl foi adicionados às culturas. Alíquotas de 0,6 mL foram coletadas a cada 20 minutos (até 120 minutos) e imediatamente centrifugadas em tubos tipo eppendorf por 30 segundos a 13.000 x g. A concentração de NH_4^+ presente no sobrenadante foi determinada no pelo método do indofenol (CHANEY e MARBACH, 1962).

3.23 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (KLASSEN et al., 1997).

Os frascos com culturas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato foram vedados com rolhas de borracha (suba-seal) e então foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada a 30°C por 1 hora. Após este período, foi coletada uma amostra de 0,5 mL para análise por cromatografia gasosa do etileno formado. Foi utilizado cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detetor de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio super seco.

Etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

3.24 ENSAIO DE INIBIÇÃO REVERSÍVEL DA NITROGENASE

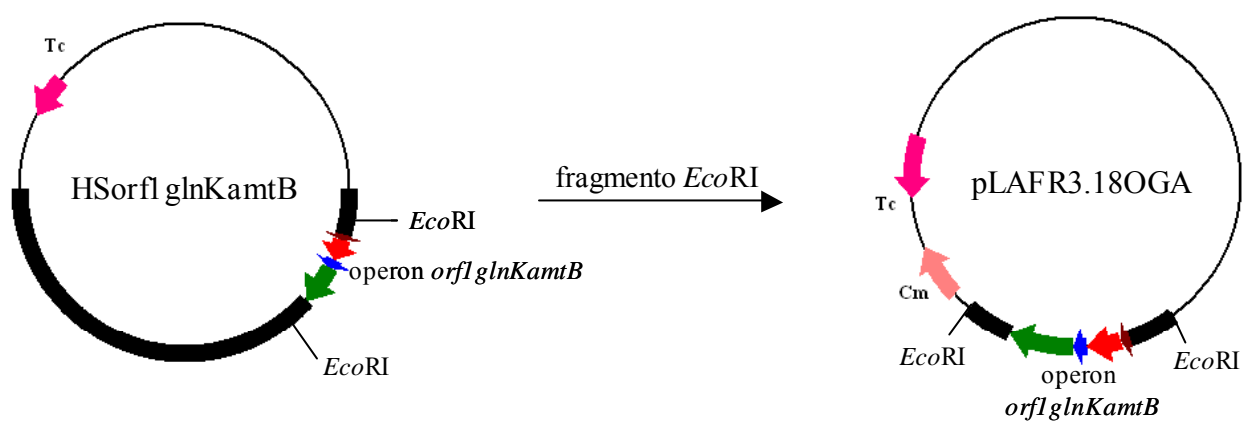
Para a realização dos experimentos de desligamento da nitrogenase, *H. seropedicae* estirpes SmR1 e LNamtB foram crescidas em frascos de 60 mL contendo 10mL de meio NFbHP-malato acrescido de 4 mmol/L de glutamato por 16-18 horas a 30⁰ C, sob agitação. Após crescimento a atividade da nitrogenase foi determinada nestas culturas pela redução de acetileno a etileno como descrito previamente (KLASSEN et al., 1997). A inibição reversível da nitrogenase foi determinada pela adição de 0,3 ou 1mmol/L de NH₄Cl e acompanhamento da atividade de nitrogenase.

3.25 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA COMPLEMENTAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

3.25.1 Construção do plasmídeo pLAFR3.18OGA

Um fragmento *Eco*RI de 5,1 kb contendo o operon *orflglnKamtB* de *H. seropedicae* foi isolado do cosmídeo HSorflglnKamtB (Programa Genopar – www.genopar.org) e subclonado no vetor pLAFR3.18Cm (NOINDORF et al., 2006) no sítio *Eco*RI, originando o plasmídeo pLAFR3.18OGA (figura 12). A seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita em meio sólido LA contendo X-gal e os antibióticos tetraciclina (10 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). A análise do plasmídeo recombinante foi feita por eletroforese em gel de agarose após digestão com a enzima *Eco*RI.

FIGURA 12 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLAFR3.18OGA



Um fragmento *EcoRI* de 5,1 kb contendo o operon *orf1glnKamtB* de *H. seropedicae* foi isolado do cosmídeo HSorflglnKamtB e subclonado no vetor pLAFR3.18Cm no sítio *EcoRI*, originando o plasmídeo pLAFR3.18OGA.

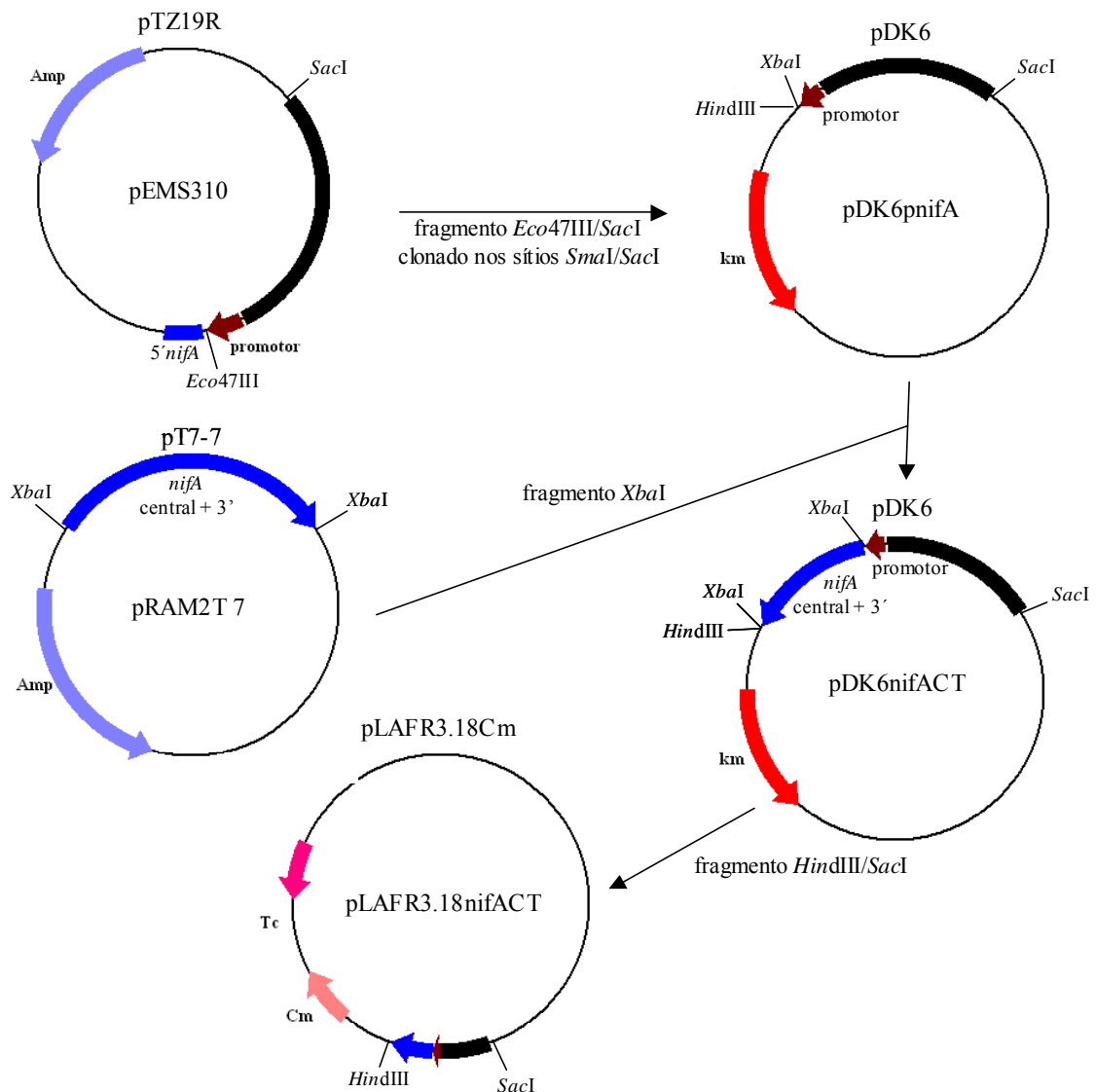
3.25.2 Construção do plasmídeo pLAFR3.18nifACT

A região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* contida num fragmento *Eco47III/SacI* do plasmídeo pEMS301 (SOUZA et al., 1991b) foi subclonada no plasmídeo pDK6 (KLEINER, PAUL e MERRICK, 1988) nos sítios *SmaI/SacI*, originando o plasmídeo pDK6pnifA (figura 13). Um fragmento *XbaI* de 1,1 kb contendo as regiões central e C-terminal do gene *nifA* de *H. seropedicae*, foi, então isolado do plasmídeo pRAM2T7 (MONTEIRO, 2001) e subclonado no plasmídeo pDK6pnifA digerido com a mesma enzima, na mesma orientação do promotor *nifA*. Este plasmídeo foi denominado pDK6nifACT (figura 13). Finalmente, o fragmento *SacI/HindIII* de 2,6 kb contendo a região promotora e as regiões central e C-terminal do gene *nifA* foi isolado do plasmídeo pDK6nifACT e subclonado no plasmídeo pLAFR3.18Cm nos mesmos sítios, originando o plasmídeo pLAFR3.18nifACT (figura 13). A seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita em meio sólido LA contendo X-gal e os antibióticos tetraciclina (10 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL).

3.25.3 Construção do plasmídeo pLAFR3.18orf1

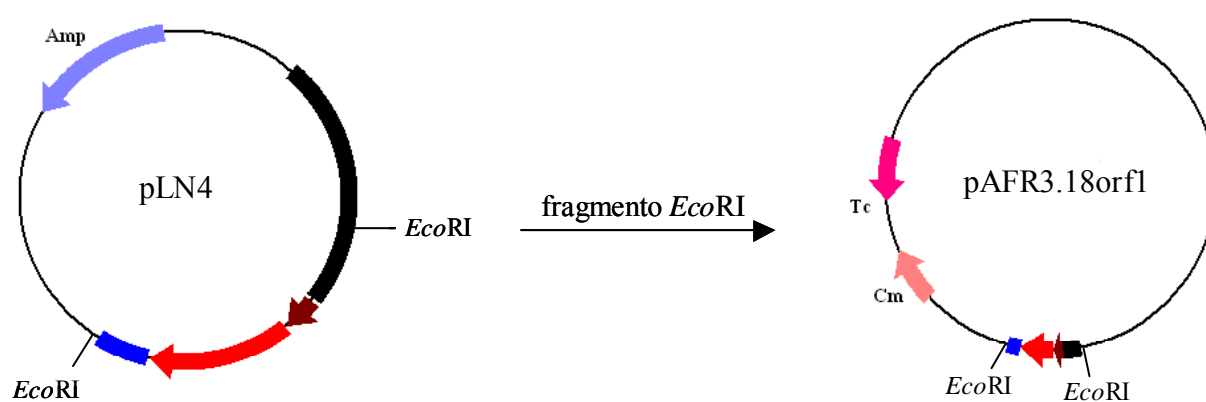
Um fragmento *EcoRI* de aproximadamente 1,6 Kb contendo o gene *orf1* e sua região promotora foi isolado do plasmídeo pLN4 e subclonado no plasmídeo pLAFR3.18Cm. A seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita em meio sólido LA contendo X-gal e os antibióticos tetraciclina (10 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). O plasmídeo resultante foi denominado pLAFR3.18orf1 (figura 14).

FIGURA 13 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLAFR3.18nifACT



A região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* contida num fragmento *Eco47III/SacI* do plasmídeo pEMS301 foi subclonada no plasmídeo pDK6 nos sítios *SmaI/SacI*, originando o plasmídeo pDK6pnifA. O fragmento *XbaI* de 1,1 kb contendo as regiões central e C-terminal do gene *nifA* de *H. seropedicae*, foi então, isolado do plasmídeo pRAM2T7 e subclonado no plasmídeo pDK6pnifA digerido com a mesma enzima, na mesma orientação do promotor *nifA*. Este plasmídeo foi denominado pDK6nifACT. Finalmente, o fragmento *SacI/HindIII* de 2,6 kb contendo a região promotora e as regiões central e C-terminal do gene *nifA* foi isolado do plasmídeo pDK6nifACT e subclonado no plasmídeo pLAFR3.18Cm nos mesmos sítios, originando o plasmídeo pLAFR3.18nifACT

FIGURA 14 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLAFR3.18orf1



Um fragmento *EcoRI* de aproximadamente 1,6 Kb contendo o gene *orf1* e sua região promotora foi isolado do plasmídeo pLN4 e subclonado no plasmídeo vetor pLAFR3.18Cm.

3.26 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE BIOSSINTÉTICA DA GLUTAMINA SINTETASE

O ensaio para determinação da atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) foi adaptado de BENDER e colaboradores (1977). As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-malato suplementado com 2 mmol/L NH_4Cl , 20 mmol/L NH_4Cl ou 5 mmol/L de glutamato, sob agitação, a 30°C. Após crescimento, foi adicionado brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (concentração final 100 $\mu\text{g/mL}$) às culturas. Após 5 minutos de incubação, sob agitação, 3 mL de cada cultura foram coletados e centrifugados a 13.000 x g por 20 segundos. As células foram lavadas com 1 mL de KCl 1%, centrifugadas novamente e ressuspensas em 50 μL da mesma solução. Para determinação da atividade de GS, 10 μL da suspensão de células foram adicionados a 65 μL de tampão de reação (0,125 mol/L HEPES, pH 8,0, 47 mmol/L cloridrato de hidroxilamina, 56 mmol/L MgCl_2 , 168 mmol/L de L-glutamato monossódico e 94 $\mu\text{g/mL}$ de CTAB). A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de ATP 0,2 mol/L, pH 7,7. Após 20 minutos a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 165 μL de solução de parada (55 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 20 g/L de ácido tricloroacético e 21 mL/L de HCl concentrado). A absorbância do cromóforo γ -glutamil hidroxamato foi determinada em 550 nm. A atividade biossintética da GS foi expressa como D.O.₅₅₀/(min.mg proteína).

3.27 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade de β -galactosidase das culturas de *H. seropedicae* foi determinada segundo MILLER (1992). As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas por 14 horas em meio NFbHP-malato na presença de 2 mmol/L, 20 mmol/L de NH_4Cl ou na presença de 5 mmol/L de glutamato, a 30°C.

Para a determinação da atividade de β -galactosidase das estirpes de *H. seropedicae* contendo as fusões *nifA::lacZ* e *nifB::lacZ*, as células foram cultivadas em

meio NFbHP-malato na presença de 10 mmol/L de NH_4Cl por 14 horas. Após este período as culturas foram lavadas e ressuspensas em 3 mL de meio NFbHP-malato sem adição de fonte de nitrogênio (D.O._{600} de 0,2) e transferidas para frascos de 25 mL. As culturas foram incubadas a 30°C por 7 horas na presença de 1,5 % de oxigênio.

Alíquotas das culturas foram coletadas e adicionadas a 900 μL de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, β -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0). Duas gotas de clorofórmio foram adicionadas ao sistema que foi agitado em vortex por 10 segundos e incubado a 30°C . O início da reação foi determinado pela adição de 200 μL de ONPG (*o*-nitrofenil β -D-galactosídeo; 4mg/mL preparado em tampão Z). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 1mol/L. A absorbância do cromóforo *o*-nitrofenol foi determinada em 420 nm e a turbidez da mistura em 550 nm. A atividade de β -galactosidase foi expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min . mg proteína). O coeficiente de absortividade molar calculado do *o*-nitrofenol é de $4190 \text{ mol/L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.29 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando solução de albumina de soro bovino como padrão. As culturas foram previamente lisadas pela adição de mesmo volume de NaOH 0,2 mol/L e incubação mínima de 1 hora a temperatura ambiente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão, os resultados serão apresentados em 4 partes: análise *in silico* dos genes *orf1* e *amtH*, expressão do operon *orf1glnKamtB*, obtenção das estirpes mutantes de *H. seropedicae* e fisiologia das estirpes mutantes obtidas.

4.1 ANÁLISE *in silico* DOS GENES *orf1* E *amtH* DE *H. seropedicae*

4.1.1 Análise da sequência do gene *orf1* de *H. seropedicae*

Em 2002 NOINDORF descreveu os genes *glnK* e *amtB* de *H. seropedicae* e mostrou que eles são transcritos a partir de um mesmo promotor e que a sua expressão é aumentada em condições limitantes de amônio e dependente da proteína NtrC. Dando continuidade a este trabalho, nós identificamos a presença de um outro gene localizado a montante de *glnKamtB*, denominado *orf1*.

O gene *orf1* de *H. seropedicae* apresenta 789 pb e codifica para uma proteína com 262 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 28 kDa. Este gene encontra-se 12 pb a montante do gene *glnK*. Sete pares de base a montante do códon de início de tradução da proteína Orf1 foi identificado um provável sítio de ligação para ribossomo. Uma possível sequência promotora do tipo -24/-12 e um possível sítio de ligação para NtrC foram identificados 79 pb e 197 pb a montante da região codificadora, respectivamente (figura 15). Nenhuma região promotora foi identificada entre os genes *orf1* e *glnK*. Juntos estes resultados sugerem que os genes *orf1*, *glnK* e *amtB* sejam co-transcritos.

FIGURA 15 – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES *orf1*, *glnK* E *amtB* DE *H. seropedicae* E SEUS PRODUTOS DE TRADUÇÃO

1	GGGGCTTGTCATGTCGGATCTCCTTGGCAGATAAGCTGTAGCTGGAATGCAAGTTTAG	59
60	CGTTTTCTGCCATCCTCAAACCGCCTTGCCTGGATGAGACCGCATTTTTACCGCAA	118
119	GTGCGGCCTGTGAAGTTTTTTCCTTCAGGAAATGCGCCGTCTTGGTGATCCGGAACGCC	177
178	CCTGCTGGCCGCGCACCAAAATGTGATTGCCGGAATGGAAGCAGGGTTAACAAAAACA	236
	NtrC NtrC	
237	AGCAATA TCGCACCAATCACGTGCA TTTTCCCTTGGTC TGCCTATTTTGAAGTGAAGT	295
296	TAGAAAAAACGTGACCAATCTCCGGTTTACCTAAAAACACAAGCCTGCCTTGCCGA	354
	-24/-12	
355	AAGAACA TGGCACGGCTCCTGCTACAGGGTTTGAGCAAACACAAAAACGACTTTTATT	413
414	GTTCAAACACAAACCAGAGGGAAGTC ATG AAG AAA CTG ATT CTT GCA ACA	464
	M K K L I L A T	8
465	GCC ATC GCC GCA TCC TTC GTT TCT ACC GTG GCC CGT GCA GAA GAC	509
9	A I A A S F V S T V A R A E D	23
510	GCC AAA CCA GAT AAT GAG TTC AGC TTC AAC GCC GCT GTC GTG AGC	554
24	A K P D N E F S F N A A V V S	38
555	GAC TAC CGC TAC CGC GGC CTG ACC CAG ACC CGC TTC GAC CCG GCC	599
39	D Y R Y R G L T Q T R F D P A	53
600	CTG CAA GTC GGT GCT GAC TAC ACC CAC AAC CCC ACC GGC CTG TAC	644
54	L Q V G A D Y T H N P T G L Y	68
645	GCC GGC ACC TGG CTG ACC AAC ATC AAG TGG ATC AAG GAC GCT GGC	689
69	A G T W L T N I K W I K D A G	83
690	GCC GTG GCC AGC CCG CCG GTC AAC ACC AAG GGC GAC ATC GAG TGG	734
84	A V A S P P V N T K G D I E W	98
735	GAC ATC TAT GGC GGC AAG CGC GGC GAC ATC GGC GGC GGC TTC ACC	779
99	D I Y G G K R G D I G G G F T	113
780	TAT GAC GTC GGC GGC CTG TAC TAC TAC TAC CCG GGC AAC ACC CTG	824
114	Y D V G G L Y Y Y Y P G N T L	128
825	GCC GAC AGC GGC GCC AAG AAC GCC AAC ACC TTC GAA CTG TAC GGC	869
129	A D S G A K N A N T F E L Y G	143
870	CAG GTC GGC TAC GGT CCG GGC TAC TTC AAG TAT TCG CAA TCG CTG	914
144	Q V G Y G P G Y F K Y S Q S L	158
915	ACC AAC CTG TTC GGC GCA GCC AAC AGC AAG TAC AGC CAG TAC TTC	959
159	T N L F G A A N S K Y S Q Y F	173
960	GAC CTG GGC GCC AAC ATC GAG ACC TAC TAC GGC GTC ATC TTG GGC	1004
174	D L G A N I E T Y Y G V I L G	188
1005	CTG CAC GTG GGT CAC CAG AAC GTG CGC GGC AAC CCC AAC CAG TTC	1049
189	L H V G H Q N V R G N P N Q F	203
1050	AGC TAC ACC GAC TGG AAG ATC GGC GTG TCC AAG ACC TTC GAC GAT	1094
204	S Y T D W K I G V S K T F D D	218
1095	CTG GCC GGC ATC ACC CTG GGC CTG GCC TAT GTC GGC ACC GAC CTC	1139
219	L A G I T L G L A Y V G T D L	233
1140	AAG GAT GGC GTG ACC ACC ACG CCG GCT TCG GAT GGC CTG AAG AAC	1184
234	K D G V T T T P A S D G L K N	248

1185	GTC	GGC	AAG	AAC	GGC	TTC	GTT	TTC	TCC	CTC	AGC	AAA	ACT	TTC	TAA	1229
249	V	G	K	N	G	F	V	F	S	L	S	K	T	F	*	262
1230	CAA	GAG	GTT	CGT	<u>ATG</u>	AAA	CTG	ATC	ACA	GCG	ATC	ATC	AAA	CCG	TTC	1274
					M	K	L	I	T	A	I	I	K	P	F	11
1275	AAG	CTG	GAC	GAG	GTG	CGT	GAA	GCC	CTC	TCC	GCG	ATC	GGG	GTG	CAA	1319
12	K	L	D	E	V	R	E	A	L	S	A	I	G	V	Q	26
1320	GGC	ATC	ACC	GTG	ACT	GAA	GTC	AAG	GGC	TTC	GGT	CGT	CAG	AAG	GGC	1364
27	G	I	T	V	T	E	V	K	G	F	G	R	Q	K	G	41
1365	CAT	ACC	GAG	CTG	TAC	CGC	GGC	GCG	GAA	TAC	GTG	GTC	GAT	TTC	CTG	1409
42	H	T	E	L	Y	R	G	A	E	Y	V	V	D	F	L	56
1410	CCC	AAG	ACC	AAG	ATC	GAG	GCG	GCG	GTG	GAC	GAC	GCC	ATC	GTC	GAA	1454
57	P	K	T	K	I	E	A	A	V	D	D	A	I	V	E	71
1455	CGC	GCG	CTC	GAA	GCC	ATC	GAG	ACC	GCT	GCC	CGC	ACC	GGC	AAG	ATC	1499
72	R	A	L	E	A	I	E	T	A	A	R	T	G	K	I	86
1500	GGC	GAC	GGC	AAG	ATC	TTC	GTC	CAG	GAC	CTG	CTG	GAC	GTG	ATC	CGT	1544
87	G	D	G	K	I	F	V	Q	D	L	L	D	V	I	R	101
1545	ATC	CGC	ACC	GGC	GAG	ACC	GGC	AAA	GAC	GCT	CTG	TAA	AAA	AGG	GGA	1589
102	I	R	T	G	E	T	G	K	D	A	L	*				112
1590	ACT	CTA	<u>ATG</u>	AGC	ATG	AAG	AAA	ATG	TTT	TCC	GGC	GCG	CTC	GCC	ATT	1634
705			M	S	M	K	K	M	F	S	G	A	L	A	I	13
1635	GGC	GCG	CTG	CTG	TTT	GCA	GTC	AGT	TTT	ACT	GCT	CCG	GCC	CAG	GCG	1679
14	G	A	L	L	F	A	V	S	F	T	A	P	A	Q	A	28
1680	CAG	GAT	GCG	CCC	AAG	CCT	GAA	GCT	GCA	GCG	GCT	GCC	GCA	GCG	GCC	1724
29	Q	D	A	P	K	P	E	A	A	A	A	A	A	A	A	43
1725	CCG	GCT	GCT	GCT	CCC	GCT	GCA	CCC	AAG	GCG	GAA	GCT	GCC	GCT	CCT	1769
44	P	A	A	A	P	A	A	P	K	A	E	A	A	A	P	58
1770	GCG	GCC	GCT	GCC	CCG	GCC	GCA	CCG	GCT	GCC	GCT	GCC	GCC	GCT	CCC	1814
59	A	A	A	A	P	A	A	P	A	A	A	A	A	A	P	73
1815	GCA	CCG	GTC	CCC	AAC	AAG	GGC	GAT	ACC	GCC	TGG	ATG	CTG	GTC	TGC	1859
74	A	P	V	P	N	K	G	D	T	A	W	M	L	V	C	88
1860	ACC	GCC	TTC	GTC	ATC	CTC	ATG	ACC	TTG	CCG	GGC	CTG	GGC	CTG	TTC	1904
89	T	A	F	V	I	L	M	T	L	P	G	L	G	L	F	103
1905	TAC	GGC	GGC	CTG	GTG	CGC	AGC	AAG	AAC	ATG	CTG	TCG	GTG	CTG	ATG	1949
104	Y	G	G	L	V	R	S	K	N	M	L	S	V	L	M	118
1950	CAG	TGC	TTC	ATG	ATC	TTC	TCG	CTG	ATC	TAC	ATC	CTG	TGG	TTC	GTC	1994
119	Q	C	F	M	I	F	S	L	I	Y	I	L	W	F	V	133
1995	TAC	GGC	TAC	AGC	ATC	GCG	TTC	ACC	GAG	GGC	AAT	GCC	TTC	TTC	GGT	2039
134	Y	G	Y	S	I	A	F	T	E	G	N	A	F	F	G	148
2040	GGC	TTC	GAT	CGC	CTG	TTC	CTG	CAC	GGT	CTG	ACG	GGT	GAC	TCC	AAC	2084
149	G	F	D	R	L	F	L	H	G	L	T	G	D	S	N	163
2085	ACC	GGC	ACC	TTC	AGC	AAG	GGC	GTG	GTC	ATT	CCG	GAG	CTG	GTC	TTC	2129
164	T	G	T	F	S	K	G	V	V	I	P	E	L	V	F	178
2130	GTC	GCC	TTC	CAG	GGT	GCG	TTC	GCG	GCC	ATC	ACT	GTG	GCG	CTG	ATC	2174
179	V	A	F	Q	G	A	F	A	A	I	T	V	A	L	I	193

2175	ATT	GGC	GCC	TTC	GCC	GAA	CGC	GTG	AAG	TTC	TCG	GCC	GTG	ATC	CTG	2219
194	I	G	A	F	A	E	R	V	K	F	S	A	V	I	L	208
2220	TTC	TCC	ATC	CTG	TGG	TTC	ACC	TTC	TCC	TAC	CTG	CCG	ATG	GCC	CAC	2264
209	F	S	I	L	W	F	T	F	S	Y	L	P	M	A	H	223
2265	ATG	GTC	TGG	TTC	TGG	CCG	GGT	CCG	GAC	GCC	TTC	ACC	GAC	GCT	GCC	2309
224	M	V	W	F	W	P	G	P	D	A	F	T	D	A	A	238
2310	GCT	GGT	GAA	AAG	GCC	ACC	GCC	ATC	TCG	GGC	TGG	CTG	TTC	CAG	AAG	2354
239	A	G	E	K	A	T	A	I	S	G	W	L	F	Q	K	253
2355	GGC	GCG	CTG	GAC	TAC	GCA	GGC	GGC	ACG	GTG	GTG	CAC	ATC	AAC	GCC	2399
254	G	A	L	D	Y	A	G	G	T	V	V	H	I	N	A	268
2400	GCT	ATC	GCC	GGC	CTG	GTC	GGT	TCC	TAT	GTG	ATC	GGC	AAG	CGT	ATC	2444
269	A	I	A	G	L	V	G	S	Y	V	I	G	K	R	I	283
2445	GGT	TTC	GGC	AAG	GAA	GCC	TTC	AAG	CCG	CAT	AGC	CTG	ACC	CTG	ACC	2489
284	G	F	G	K	E	A	F	K	P	H	S	L	T	L	T	298
2490	ATG	GTC	GGC	GCC	TCG	CTG	CTG	TGG	TTC	GGC	TGG	TTC	GGC	TTC	AAC	2534
299	M	V	G	A	S	L	L	W	F	G	W	F	G	F	N	313
2535	GCC	GGC	TCG	GGT	CTG	GAA	GCC	AAC	GGC	ACT	GCT	GCC	CTG	GCC	TTC	2569
314	A	G	S	G	L	E	A	N	G	T	A	A	L	A	F	328
2570	GTC	AAC	ACC	ATC	CTG	GCA	ACG	GCG	GCT	GCT	GTG	CTG	TCC	TGG	AGC	2614
329	V	N	T	I	L	A	T	A	A	A	V	L	S	W	S	343
2615	TTC	GGC	GAA	TGG	ATC	GGC	AAG	GGC	AAG	CCC	TCG	ATG	CTG	GGC	GCC	2659
344	F	G	E	W	I	G	K	G	K	P	S	M	L	G	A	358
2660	GCT	TCC	GGC	GCG	GTG	GCT	GGT	CTG	GTG	GCG	ATC	ACC	CCG	GCG	GCT	2704
359	A	S	G	A	V	A	G	L	V	A	I	T	P	A	A	373
2705	GGT	TTC	GTG	GGC	GTC	ATC	GGC	GCC	GTG	GTC	ATG	GGC	CTG	ATC	GCT	2749
374	G	F	V	G	V	I	G	A	V	V	M	G	L	I	A	388
2750	GGC	CTG	CTG	TGC	CTG	TGG	GGC	GTG	AGC	GGC	CTG	AAG	AAG	ATC	CTG	2794
389	G	L	L	C	L	W	G	V	S	G	L	K	K	I	L	403
2795	GGT	TCC	GAC	GAT	GCG	CTG	GAC	GTG	TTC	GGC	GTG	CAC	GGC	GTG	GGC	2839
404	G	S	D	D	A	L	D	V	F	G	V	H	G	V	G	418
2840	GGC	ATC	CTG	GGC	GCC	ATC	CTG	ACC	GGC	GTG	TTC	GCA	GCC	CCC	AGC	2884
419	G	I	L	G	A	I	L	T	G	V	F	A	A	P	S	433
2885	CTG	GGC	GGC	ACC	GGC	ATC	TAC	GAC	TAC	GTG	GCC	AAC	GCT	GTT	GCG	2929
434	L	G	G	T	G	I	Y	D	Y	V	A	N	A	V	A	448
2930	CCT	GAC	TAC	TCC	ATC	GGC	GGC	CAG	GTC	TGG	ATC	CAG	TTC	CAG	GGC	2974
449	P	D	Y	S	I	G	G	Q	V	W	I	Q	F	Q	G	463
2975	GTG	CTG	ACC	ACC	GTG	GTC	CTG	TCG	GGT	GTG	GTC	TCC	TTC	ATC	GCC	3019
464	V	L	T	T	V	V	L	S	G	V	V	S	F	I	A	478
3020	TAC	AAG	ATC	GTT	GAC	GTC	GTC	ATC	GGC	CTG	CGT	GTG	ACC	GAG	GAA	3064
479	Y	K	I	V	D	V	V	I	G	L	R	V	T	E	E	493
3065	GAA	GAA	CGC	GAA	GGC	CTG	GAT	ATC	TCC	AGC	CAC	GGC	GAA	TCG	GCT	3109
494	E	E	R	E	G	L	D	I	S	S	H	G	E	S	A	508

```

3110  TAC CAC TAA GCCTCTGCCGTACTGATCGACTGAGTCTGCAGTATTCCTTCGGGGCC 3166
509   Y  H  *  ──────────▶─────────▶─────────▶─────────▶─────────▶
3167  GCGACGGCCTCTTTCAAAGGCGCCTTCGGGCGCCTTTTTTCATTGCCTGGATGCAAGC 3225

```

A sequência do gene *orf1* está em vermelho e a sequência dos genes *glnK* e *amtB* estão em azul e verde, respectivamente. A sequência de aminoácidos traduzida dos genes *orf1*, *glnK* e *amtB* está mostrada em código de uma letra abaixo do códon correspondente. Os prováveis códons de início de tradução das proteínas estão sublinhados e os códons de término de tradução estão indicados por asteriscos. Os prováveis sítios de ligação para ribossomo estão em negrito. Um possível promotor localizado a montante do gene *orf1* está destacado em cinza, e prováveis sítios para ligação da proteína NtrC estão destacados em rosa. As regiões intergênicas estão mostradas em preto. Uma região palindrômica a jusante do gene *amtB* está indicada por setas e a sequência de bases T está em itálico. ↓ Indica um potencial sítio de clivagem para sequência sinal de exportação localizado entre os resíduos 21 e 22 da proteína Orf1. Os genes *glnK* e *amtB* foram sequenciados por NOINDORF (2002) e a sequência do gene *orf1* foi obtida do banco de dados do Programa Genopar que sequenciou o genoma de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

Quando comparada com o banco de dados (GenBank) através do programa BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997) a sequência deduzida de aminoácidos da proteína Orf1 apresentou similaridade com proteínas hipotéticas de *Ralstonia eutropha* (55%) (ZP_00171483), *Ralstonia metallidurans* (55%) (ZP_00594283), *Ralstonia solanacearum* (54%) (NP_518462), *Dechloromonas aromatica* (52%) (YP_283281) e *Thiobacillus denitrificans* (52%) (YP_313997). Assim como em *H. seropedicae*, os genes que codificam para estas proteínas estão localizados a montante dos genes *glnK* e *amtB*, e parecem ser co-transcritos com estes a partir de um promotor do tipo σ^{54} . Genes codificando para proteínas similares a Orf1 foram encontrados em α - β - e γ -proteobactérias. Alguns organismos apresentam duas ou três proteínas similares a Orf1.

O programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991) foi utilizado para prever a localização celular da Orf1. Esta análise indicou que esta proteína está localizada na membrana bacteriana externa ou no espaço periplasmático. Um provável sítio de clivagem para sequência sinal de exportação, localizado entre os resíduos 21 e 22, foi identificado na Orf1 através do programa SignalP V3.0 (BENDTSEN et al., 2004) (figura 15). Após a clivagem do peptídeo sinal, a Orf1 apresenta 241 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 26 kDa.

A sequência de aminoácidos da Orf1 foi analisada através do programa COGnitor (TATUSOV et al., 2000) que compara uma sequência de proteína com um banco de dados COG (“Cluster of Orthologous Groups of proteins”). Cada COG consiste de proteínas que geralmente compartilham função ou domínio. Esta análise mostrou que a Orf1 assemelha-se a proteínas receptoras de membrana externa.

4.1.2 Análise da sequência do gene *amtH* de *H. seropedicae*

O gene *amtH* de *H. seropedicae* apresenta 1203 pb e codifica para uma proteína com 400 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 42 kDa. Quando comparada com o banco de dados (GenBank) através do programa BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997) a sequência deduzida de aminoácidos desta proteína apresentou similaridade com transportadores de amônio de

vários organismos, entre estes *Dechloromonas aromatica* (89%) (YP_286902), *Polaromonas* sp. (88%) (YP_551665), *Ralstonia metallidurans* (87%) (EAN52385) e *Ralstonia eutropha* (87%) (YP_298238).

O possível codón de início de tradução do gene *amtH* foi identificado na posição 237 e codifica um resíduo de valina, que é um códon de início de tradução alternativo (figura 16). Um potencial sítio para ligação de ribossomo foi localizado 7 pb a montante deste códon. Uma possível seqüência promotora do tipo -24/-12 e um possível sítio para ligação de NtrC também foram identificados 51 pb e 142 pb a montante da região codificadora, respectivamente (figura 16). Estes resultados sugerem que a expressão do gene *amtH*, assim como o operon *orf1glnKamtB*, é regulada pela proteína NtrC sob condições limitantes de nitrogênio.

Análises para determinar a localização celular da proteína AmtH, realizadas pelo programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991), indicaram sua localização na membrana interna da célula. Um potencial sítio de clivagem para seqüência sinal de exportação localizado entre os resíduos 28 e 29, foi identificado através do programa SignalP V3.0 (BENDTSEN et al., 2004) (figura 16). Após a clivagem do peptídeo sinal a proteína AmtH apresenta 372 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 39 kDa.

FIGURA 16 – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE *amhH* DE *H. seropedicae* E SEU PRODUTO DE TRADUÇÃO

1	CGACACTGGGGGAATGGAATACCGCCCCCATCCAGC	NtrC	GCACCAAAATGAAGCT	CGACAT	59
60	CCTCCCGCCCCCTCTGCAT	NtrC	GCACGGAGTTCGTGCA	GCACTTTGCCGGACAAGACACTGA	118
119	CGCACTAAAAAAGTCTTTTTGAATCAATGATCTGCTGAATTCTCACCAAAAT	-24/-12	TGGAACGG		177
178	AAATTGCTTTAGTCCTGGCTTTCAAGCATTTCTCGCACACTTTT		GGGAGATT	TTTCTG	236
237	GTG GAC GAT CAC AAA AAC GGC GCA GAC GCC CTC TTC ATC CTG CTA				282
1	V D D H K N G A D A L F I L L				15
283	GGG GCG ATC ATG ATC CTG GCC ATG CAT GCC GGC TTC GCC			TTC CTT	327
16	G A I M I L A M H A G F A			F L	30
328	GAG CTG GGC ACA GTG CGC AAG AAG AAC CAG GTC AAT GCC CTG GTC				372
31	E L G T V R K K N Q V N A L V				45
373	AAG ATC CTG GCG GAC TTT GCC GTA TCG ACC ATC GTC TAT TTC TTC				417
46	K I L A D F A V S T I V Y F F				60
418	ATC GGC TAC TAC GTC GCC TAT CGC GTG AGC TTC TTC GCC GGC GCC				462
61	I G Y Y V A Y R V S F F A G A				75
463	GAG ACG CTG GCG CAG CGC AGC GGC TTC GAG CTG GTG AAG TTC TTC				507
76	E T L A Q R S G F E L V K F F				90
508	TTC CTG CTG ACC TTT GCC GCC GCG ATC CCG GCC ATC ATC TCG GGC				552
91	F L L T F A A A I P A I I S G				105
553	GGC ATT GCC GAG CGT TCC AAG TTC AAT CCG CAG CTG GTG GCC ACG				597
106	G I A E R S K F N P Q L V A T				120
598	GCC GTG CTG GTG GGC CTG GTC TAT CCC TTC TTC GAG GGC ATT GCA				642
121	A V L V G L V Y P F F E G I A				135
643	TGG AAC CAG CAC CTG GGC GTG CAA GCC TGG CTG GCC GCC ACC TTC				687
136	W N Q H L G V Q A W L A A T F				150
688	GAC GCA GAA TTC CAC GAC TTC GCC GGC TCC ATC GTG GTC CAC GCC				732
151	D A E F H D F A G S I V V H A				165
733	GTC GGC GGC TGG ATC GCC CTG CCC GCC GTG CTG CTG CTG GGC GCG				777
166	V G G W I A L P A V L L L G A				180
778	CGC CGA GGC CGC TAC AGC AAG GAA GGC GCG GTT GCT GCG CAT CCG				822
181	R R G R Y S K E G A V A A H P				195
823	CCC TCC AAC ATT CCC TTC CTG GCA TTG GGC GCG TGG ATC CTG ACG				867
196	P S N I P F L A L G A W I L T				210
868	GTG GGC TGG TTC GGC TTC AAC GTG ATG AGC GCG CAG ACG CTG GAC				912
211	V G W F G F N V M S A Q T L D				225
913	AAG ATG AAT GGC CTG GTC GCG ATG AAT TCG CTC ATG GCC ATG GCC				957
226	K M N G L V A M N S L M A M A				240
958	GGC GGC ACA CTG GTA GCG CTG CTG ATG GGC CGC AAT GAC CCC GGC				1002
241	G G T L V A L L M G R N D P G				255
1003	TTC GCC TAC AAC GGC CCG CTG GCC GGC CTG GTG GCG GTA TGC GCC				1047
256	F A Y N G P L A G L V A V C A				270

1048	GGC TCG GAC CTG ATG CAC CCG CTG GGC GCA CTG GTC ACC GGC GGC	1092
271	G S D L M H P L G A L V T G G	285
1093	ATT GCC GGG GCG ATC TTC GTG TGG ATG TTT ACC CGC ACC CAG AAC	1137
286	I A G A I F V W M F T R T Q N	300
1138	AAA TGG AAG ATC GAC GAC GTG CTG GGC GTG TGG CCG CTG CAC GGG	1182
301	K W K I D D V L G V W P L H G	315
1183	CTG TGC GGA TTG TGG GGC GGC CTG GCG GCG GGC ATC TTC GGC CTG	1227
316	L C G L W G G L A A G I F G L	330
1228	CAG GCG CTG GGG GGC CGG GGT GGC GTG TCC TTC CTG TCA CAA CTG	1272
331	Q A L G G R G G V S F L S Q L	345
1273	ATC GGC AGC GTG ATG GGC ATT GTC ATT GCA GCG CTG GGC GGG TGG	1317
346	I G S V M G I V I A A L G G W	360
1318	ATC GTG TAT GGC TTG CTC AAG AAG GCA GTC GGT ATC CGC CTT GAT	1362
361	I V Y G L L K K A V G I R L D	375
1363	CCG GAG CAG GAG TTC GAA GGG GCG GAT CTG GCC ATT CAC AAG ATT	1407
376	P E Q E F E G A D L A I H K I	390
1408	TCT TCT ACG GCG GAG AGG GAG ACC AGT TGG TAA ATGAATTGCAGCGCTG	1452
391	S S T A E R E T S W *	400
1452	GCAGAAAAACATCCGTTGAACATAGAGCTTGTCTATCAATGGCCAGGAACGATGATGAC	1511
1512	TCCTGGCCAATGGGCAACAGCGTACTGCCAGTGAGCTCTTCAACCTGAATCGCCAAGTA	1570
1571	TTGCGTGGGACGCATCAACTACTTGCCAGAACAACAGCGCCTTCTGCAAATACACCTC	1629
1630	GGTACGAGAATTGCTAAAGTCACCATTGGACGCCGCGCCTCAGGCATATCAGTCCGAA	1688
1689	TAAATTTAATATTCGCCAAGTTTTCCTTCTAGCTCAGCTGTTTCTTGCTGGGATCCGT	1747

O gene *amtH* está mostrado em azul. A sequência de aminoácidos traduzida do gene *amtH* está mostrada em código de uma letra abaixo do códon correspondente. O provável códon de início de tradução da proteína AmtH está sublinhado e o códon de término de tradução está indicado por asterisco. O provável sítio de ligação para ribossomo está em negrito. Um possível promotor localizado a montante do gene *amtH* está destacado em cinza, e prováveis sítios para ligação da proteína NtrC estão destacados em rosa. Duas regiões palindrômicas a jusante do gene *amtH* estão mostradas por setas e a sequência de bases T ou A estão em itálico. As regiões intergênicas estão mostradas em preto. ↓ Indica um potencial sítio de clivagem para sequência sinal de exportação localizado entre os resíduos 28 e 29 da proteína AmtH. A sequência do gene *amtH* foi obtida do banco de dados do Programa Genopar que sequenciou o genoma de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

A análise de hidrofobicidade da proteína AmtH foi realizada utilizando o programa HMMTOP (v. 2.0) (TUSNÁDY e SIMON, 2001). Esta análise revelou que esta proteína possui provavelmente 10 segmentos transmembrana após a clivagem do peptídeo sinal, com a região N-terminal e a região C-terminal voltada para o citoplasma da célula. A mesma análise realizada na proteína AmtB de *H. seropedicae* sugere 11 hélices transmembrana após clivagem do peptídeo sinal com a região N-terminal voltada para o espaço periplasmático, enquanto a região C-terminal está voltada para o citoplasma da célula (NOINDORF, 2002). A região transmembrana M1 da proteína AmtH indicada na figura 17, provavelmente corresponde ao peptídeo sinal. Os peptídeos sinais, assim como as hélices transmembrana, contêm segmentos hidrofóbicos, o que faz com que a maioria dos métodos computacionais para predição de regiões transmembrana não sejam capazes de distingui-los (KAHSAY, GAO e LIAO, 2005). O modelo estrutural obtido para a proteína AmtH de *H. seropedicae* está de acordo com os resultados obtidos por von WIREN e MERRICK (2004), que mostraram que os transportadores de amônio apresentam 9-12 hélices transmembrana e que a maioria apresenta a região C-terminal voltada para o citoplasma.

As proteínas AmtH e AmtB de *H. seropedicae* apresentam 27% de identidade e 44% de similaridade. As proteínas que apresentam maior similaridade com a proteína AmtH de *H. seropedicae* apresentam em torno de 400 a 450 aminoácidos e são monocistrônicas. Já as proteínas que apresentam maior similaridade com a proteína AmtB de *H. seropedicae* apresentam em torno de 450 a 550 aminoácidos e são co-transcritas com proteínas do tipo PII. As proteínas similares a AmtB apresentam a região N-terminal mais longa do que aquelas similares a AmtH. A figura 17 mostra o alinhamento, através do programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), de proteínas Amt de diversos organismos. A similaridade das seqüências permitiu definir dois grupos distintos: proteínas similares a AmtB e proteínas similares a AmtH. Apesar da diferença observada, todas as proteína analisadas apresentam o domínio conservado D-[FYWS]-A-G-[GSC]-x(2)-[IV]-x(3)-[SAG](2)-x(2)-[SAG]-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFYWA](2)-x-[GK]-x-R. Este domínio foi identificado através do programa InterPro (APWEILER et al., 2001), e é

comum a todas as proteínas transportadoras de amônio. Todas as proteínas Amt analisadas apresentam os resíduos envolvidos na estabilização de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ durante o transporte, segundo modelo estrutural obtido em *E. coli* (KHADEMI et al., 2004) (figuras 3 e 17). Este resultado sugere que tanto AmtB quanto AmtH de *H. seropedicae* são proteínas envolvidas no transporte de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO OPERON *orf1glnKamtB*

A transcrição conjunta dos genes *glnK* e *amtB* de *H. seropedicae* foi demonstrada anteriormente (NOINDORF, 2002). Para comprovar estes resultados e verificar se o gene *orf1* é co-transcrito com os genes *glnK* e *amtB*, as fusões plasmidiais *orf1::lacZ* (plasmídeo pMPporf1), *glnK::lacZ* (plasmídeo pPWpglnK) e *amtB::lacZ* (plasmídeo pPWpamtB) foram introduzidas em *H. seropedicae* estirpe SmR1. A atividade de β -galactosidase das fusões foi determinada em células cultivadas em meio NFbHP-malato contendo NH_4Cl (2 mmol/L ou 20 mmol/L) ou glutamato (5 mmol/L) (Tabela 3). Células contendo os plasmídeos vetores pMP220 e pPW452 ou sem plasmídeo apresentaram níveis basais de atividade de β -galactosidase. Em contraste, células carregando o plasmídeo pMPporf1 apresentaram atividade de β -galactosidase elevada e regulada por amônio. A expressão da β -galactosidase da fusão *orf1::lacZ* foi cerca de 20 vezes maior em células cultivadas em glutamato e em 2 mmol/L de NH_4Cl , em relação àquelas cultivadas em 20 mmol/L de NH_4Cl . As células contendo os plasmídeos pPWamtB ou pPWpglnK apresentaram atividade de β -galactosidase muito baixas, independentemente dos níveis de amônio. Estes resultados indicam que os genes *orf1*, *glnK* e *amtB* são co-transcritos a partir de um promotor localizado a montante do gene *orf1*, corroborando a análise *in silico* (item 4.1.1) (figura 15).

FIGURA 17 – ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS AmtB E AmtH DE *H. seropedicae* COM OUTRAS PROTEÍNAS PERTENCENTES A FAMÍLIA Amt


Polaromonas sp	-----
P.naphthalenivorans	-----
R.ferrireducens	-----
D.aromatica	-----
R.eutropha	-----
R.metallidurans	-----
AmtH <i>H. seropedicae</i>	-----
Azoarcus sp	-----
M.capsulatus	-----
T.denitrificans	-----
R.eutropha	-----MTTWFKRILTAGAMALAIG
R.metallidurans	-----MKTWFKRILTAGAMTLALG
AmtB <i>H. seropedicae</i>	-----MSMKKMFSGALAIGALLFAVS
D.aromatica	-----MKRLALLALVGAVG
Amt-3 <i>M. capsulatus</i>	-----MKNIPSLVTLACLG
Polaromonas sp	-----MKKFLASLVGLSLLGTGA
P.naphthalenivorans	-----MKKLIASLLLGLSLLGTGA
R.ferrireducens	MTLNKSCASAPARPARRRCKRLAPTLMRKLTMKKLLSFALGLSLLAGGS
Amt Azoarcus sp	-----MKKLYALLPAALALGLAGG
T.denitrificans	-----MKKLFASFGLILALLAPG-
	: :
Polaromonas sp	-----ME
P.naphthalenivorans	-----ME
R.ferrireducens	-----ME
D.aromatica	-----ME
R.eutropha	-----MD
R.metallidurans	-----MD
AmtH <i>H. seropedicae</i>	-----VD
Azoarcus sp	-----ME
M.capsulatus	-----MPLIFGVCCLVVAAAHMVPAARAAAGE
T.denitrificans	-----ME
R.eutropha	TAGVGLSTHAVAQDKPAEEASAPAAAAAPAAAAPAAAAAPAAATTAAAPAE
R.metallidurans	TAGLGLSTHAVAQDKPAEEASAATASATPAAA---VAAPAAATPAAAPAE
AmtB <i>H. seropedicae</i>	FTAPAQAQDAPKPE--AAAAAAAAPAAAPAAKAEAAAPAAAAAP-AAAPAA
D.aromatica	FGAPAWAEEKAAAP-EAVAATAPAAAPAAAAAP---AAAPAAAAAPAAAPAA
Amt-3 <i>M. capsulatus</i>	FSAAAQAE GATEIVETVTVVETVQQAATPAVPTP-----
Polaromonas sp	AVMAQAPAAAAPAASA---AEAKPAEAAAAPA-APAAAAAPAAAAAPA--A
P.naphthalenivorans	TAWAQAPAEAPAATASAPAEAKPDAAAAPASAPADTAAPAAAAAPAPAAEA
R.ferrireducens	AALAQAPAATAEPAAASASAPAEAKPAEAAAAPASVAPAAAATPAA---
Amt Azoarcus sp	SALAQEAATAVAPAV-----
T.denitrificans	-LAAQDAAVPMDGAAAVETAPAAVAPAAAVP-----

M1



Polaromonas sp	ALK-----QGS DALFILLGGIMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
P.naphthalenivorans	ALK-----QGADALFILLGGIMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
R.ferrireducens	ALK-----QGADTLFILLGAVMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
D.aromatica	TYQ-----SSSNVLFVLLGAIMVLAMHAGFAFLEVGTVRKKNQVNAL
R.eutropha	NWK-----TGTDAMFILLGAIMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
R.metallidurans	NLK-----TGTDAMFILLGAIMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
AmtH H.seropedicae	DHK-----NGADALFILLGAIMILAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
Azoarcus sp	QFN-----PPADVLFVLLGAIMVLAMHAGFAFLEVGTVRKKNQVNAL
M. capsulatus	FFNGLLGKRMTKSADVLFVLLGAIMVLAMHAGFAFLEVGTVRKKNQVNAL
T. denitrificans	ALQ-----SGSDVLFVLLGGIMVLAMHAGFAFLELGTVRKKNQVNAL
R.eutropha	AAAAPAAPVPNKGDTAWLLVSTAFVILMTLPGLALFYGGLVRSKNMLSVL
R.metallidurans	AAAAPAAPVPNKGDTAWLLVSTTFVILMTLPGLALFYGGLVRSKNMLSVL
AmtB H.seropedicae	AAAAP-APVPNKGDTAWMLVCTAFVILMTLPGLGLFYGGLVRSKNMLSVL
D.aromatica	APIPP-----NKGDNAWVMISAALVILMSIPGLALFYGGLVRTKNMLSVL
Amt-3 M. capsulatus	-----DKGDTAWMIVATVLTLMVIPGLALFYGGMVRAKNMLSVL
Polaromonas sp	SAAAAPAPVPNKGDTAWMMVSTLLVIMMTVPGLALFYGGLVRSKNMLSVL
P.naphthalenivorans	SAAAAPAPVPNKGDTAWMMVSTILVILMVVPGGLALFYGGLVRSKNMLSVL
R. ferrireducens	-AAAAPAPVPNKGDTAWMMVSTLLVILMTVPGLALFYGGLVRSKNMLSVL
Amt Azoarcus sp	-EAAAAAPIVEKGDVAWIMTSTLLVLFMALPGLALFYGGLVRSKNMLSVL
T.denitrificans	-AETAATPVPDKGDTTMMVSTLLVLMIVPGVALFYGGLVRAKNMLSVL
	. . : . : . * . . : * * * * . . *

M2



Polaromonas sp	VKILVDFS SVSTVVFVVG YAVAYGTH-----FFVGAEQLAAK-----
P.naphthalenivorans	VKILVDFS SVSTVAYFAVGYGVAYGTH-----FFVGAEELAVK-----
R.ferrireducens	VKILVDFS SVSTIAYFLVGYGVAYGTH-----FFVGAEQLAAK-----
D.aromatica	VKILSDFGVSTVAYFFVGYTIAYGVN-----FFSGVETLLQK-----
R.eutropha	VKILVDFAVSTIAYFFIGYTVAYGVQ-----FMSGADTLAQK-----
R.metallidurans	VKILVDFAVSTISYFFIGYTVAYGVQ-----FMSGADVLAQK-----
AmtH H.seropedicae	VKILADFAVSTIVYFFIGYVAYRVS-----FFAGAETLAQR-----
Azoarcus sp	VKIISDFAMSSIAYFIVGYSLAYGSD-----FFVGADRLVAD-----
M. capsulatus	VKILSDFAMSTIAYFFIGYELAYGVD-----FFDSALALTVD-----
T.denitrificans	VKILTDFS SVSTIAYFFIGYIAYGVS-----FFSGAALSAQ-----
R.eutropha	MQCLVIFS SVSLLWAVYGYSFAFTEG--NAFFGGTDRLFMKGLTVDAV-
R.metallidurans	MQCLMIFS VISILWAIYGYSAFAFTEG--NAFFGGTDRLFMKGLTVDAV-
AmtB H.seropedicae	MQCFMIFS LIYILWFVYGYSAFAFTEG--NAFFGGFDRFLHGLTGDSN-
D.aromatica	MQVFVTFSLISVLWVVYGYSAFAFTEG--NEFFGVLDKFLKGVTVD SV-
Amt-3 M. capsulatus	MQVFVIFS LMAVLWAVYGYSIAFAFTEG--GVFFGSLDKFA LGVTPDST-
Polaromonas sp	MQVMVTF SMIVVLWFIYGYSLAFTEG--NAFFGGFDRLFMKGVWDNAAG
P.naphthalenivorans	MQVMVTF SLIVVLWFIYGYSLAFTEG--NAF IGGFDRLFMKGIWDNAAG
R.ferrireducens	MQVMVTF SLIVVLWFIYGYSLAFTEG--NAF IGGFDRLFMKGIWDNVAG
Amt Azoarcus sp	MQVMVVF SLIAVLWVFYGYSLAFTEG--APF IGSLDKLFLSGVTIDTL-
T.denitrificans	TQVMAIFCLISVLWAVYGYSLAFGDGGGMNWAIGDLSKFLAGITPDST-
	: : * : : : ** * : : : :

M3



Polaromonas sp	-----NGYELVKFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERARFY PQLIA
P.naphthalenivorans	-----NGYELVRFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERARFY PQLIA
R. ferrireducens	-----NGFELVRFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERARFW PQLIA
D.aromatica	-----SGFELTKFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERAKFHPQ LIA
R.eutropha	-----SGYELVKFF FLAT F AAAIPAIISGGIAERSRFPNQLCA
R.metallidurans	-----SGYELVKFF FLAT F AAAIPAIISGGIAERSRFPNQLAA
AmtH H.seropedicae	-----SGFELVKFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERSKFNPQLVA
Azoarcus sp	-----SGYELVKFF FLLT F AAAIPAIISGGIAERARFGPQ LIA
M. capsulatus	-----NGYGLVKFF FLLT F AAAIPAIVSGGIAERSKFNPQLAA
T.denitrificans	-----NGYALVKFF FLLT F AAAIPAIVSGGIAERARFNPQLAA
R.eutropha	----AATFSKGVVPELGYFA FQCAF AAITCGLIIGAF AERAKFS AVLVF
R.metallidurans	----AATFSKGVVPELGYFA FQCAF AAITCSLIIGAF AERAKFS AVLVF
AmtB H.seropedicae	----TGTFSGGVIP ELVFVA FQCAF AAITVALIIGAF AERVKFS AVLIF
D.aromatica	----AATFSKGVNISEFAYVI FQCAF AAITCGLIVGAF AERAKFAAILVF
Amt-3 M. capsulatus	----AATFSKGVVIPLEIIVFA FQLT FACITPALIVGAF AERMKFS AVLIF
Polaromonas sp	TFANAATFSKGVVIPLEIVFA FQAT FAGITCTLIVGAF AERIKFS AVLIF
P.naphthalenivorans	TFANAATFSKGVVIPLEIVFA FQAT FAGITCTLIVGAF AERIKFS AVLIF
R.ferrireducens	TFANGATFSKGVVIPLEIVFA FQAT FAGITCTLIVGAF AERMKFS AVLIF
Amt Azoarcus sp	----ADTFTDNVKLPEFAFVA FQAT FAGITGALVVGAF AERMKFS AVLIF
T.denitrificans	----AATFSDGVVIPLETFVA FQLT FAAITVALIVGGLAERVKFS ALLVF
	: : : * : ** : : * . : ** : * . :


M4



Polaromonas sp	TAVIVGLVYPFFEGIAWN-----QHFGVQAWIKSLTGAEFHDFA
P.naphthalenivorans	TAVIVGFVYPFFEGIAWN-----HHFGVQAWIASVSGAEFHDFA
R.ferrireducens	TAVIVGFVYPFFEGIAWN-----QHFGVQGWIKSLTGAEFHDFA
D.aromatica	TFLLVGFVYPFFEGIAWN-----QAFGIQAWLKASFGEFHDFA
R.eutropha	TFVLVGFVYPFFEGIAWN-----QRFGIQDWITHTLTGAPFHDFA
R.metallidurans	TFVLVGFVYPFFEGIAWN-----NRFGIQDWIASVTGAPFHDFA
AmtH H.seropedicae	TAVLVGLVYPFFEGIAWN-----QHLGVQAWLAATFDAEFHDFA
Azoarcus sp	TFVIVGFLYPFFEGVWN-----GNFGFQSWLEAAFGAKFHDFA
M.capsulatus	TFLLVGFVYPFFEGIAWN-----SNLGFQGWLQTRFGAQFHDFA
T.denitrificans	TFALVGFVYPFFEGMVWN-----GNYGVQDWLAATGAKFHDFA
R.eutropha	VVLWFTFSYIPIAHMOVWFWPGPDAFTDAAAGTAATAKSGWLFQKGALDFA
R.metallidurans	VVLWFTFAYIPMAHMOVWFWPGPDAYTDAAAGTAATAKAGWLFQKGALDFA
AmtB H.seropedicae	SILWFTFSYLPMAHMOVWFWPGPDAFTDAAAGEKATAISGWLFQKGALDYA
D.aromatica	MVIWFTLSYIPMAHMOVWYWAGPDAYIDAAAGELAGKTAGFLFQKGALDFA
Amt-3 M.capsulatus	MVLWFTFSYLPMAHMOVWYWAGPDAYTDAAAGEKATATAGFLFQKGALDFA
Polaromonas sp	MAIWFTFSYAPIAHMOVWFWMGPDAYTGKEVVDAMTGKAGYIWQMGALDFA
P.naphthalenivorans	MVIWFTFSYAPMAHMOVWFWMGPDAYTGKEVVDAMTGKAGYIWQTGALDFA
R.ferrireducens	MALWFTFSYAPIAHMOVWFWMGPDAYGAKDVVDAMNAKAGYLWQSGALDFA
Amt Azoarcus sp	SVIWFTLCYLPICHMVW-----GPGGMLLDDGALDFA
T.denitrificans	AVLWFTFSYLPMAHMOVW-----ATGGYLFKEKGDLDFA

. : * : : *

M5



Polaromonas sp	GSIVVHAVGGWIALPAVILLGARSNRYRKDGAVSAHPPSNIPFLALGAWI
amtHP.naphthalenivorans	GSIVVHALGGWIALPAVILLGARSNRYRKDGAMSAHPPSSIPFLALGAWI
R.ferrireducens	GSVVVHAVGGWIALPAVILLGARANRYRKDGGISAHPPSSIPFLALGAWV
D.aromatica	GSVVVHAMGGWIALPAVLLLGARYGRYKNDGRISAHPPSSIPFLALGAWI
R.eutropha	GSVVVHAVGGWIALPAVLLLGARRGRYQKDGRISAHPPSNIPFLALGAWV
R.metallidurans	GSVVVHAVGGWIALPAVLLLGARRGRYQKDGRISAHPPSNIPFLALGAWV
AmtH H.seropedicae	GSIVVHAVGGWIALPAVLLLGARRGRYSKEGAVAAHPPSNIPFLALGAWI
Azoarcus sp	GSVVVHAFGGWIALPAVLLLGARRGRYHKNGAISAHPPSSIPFLALGAWI
M. capsulatus	GSVVVHAVGGWIGLAAVLLLGPRRGRYHRDGMIAAHPPSSIPFLALGAWI
T.denitrificans	GSVVVHAVGGWIALPAVLLLGARRGRYKGDGMMSAHPPSNIPFLALGAWI
R.eutropha	GGTVVHINAAGVLVGAFMFGKRIGFGRE-----AIRPHSLTFTMVGASL
R.metallidurans	GGTVVHINAAGVLVGAFMFGKRIGFGRE-----AIRPHSLTFTMVGASL
AmtB H.seropedicae	GGTVVHINAAGVLVGSYVIGKRIGFGKE-----AFKPHSLTFTMVGASL
D.aromatica	GGTVVHINAAGVLVGAYMVGKRSGLGNV-----SMAPHSLTFTMIGASL
Amt-3 M.capsulatus	GGTVVHINAGIAGLVGCLLVGKRIGYKKE-----SMAPHSVPMTMIGASL
Polaromonas sp	GGTVVHINAAGVLVGAFVIGKRIGYGKE-----SMAPHSLTFTMVGASL
P.naphthalenivorans	GGTVVHINAAGVLVGAFMVGKRIGYGKE-----AMAPHSLTFTMVGASL
R.ferrireducens	GGTVVHINAAGVLVGAYMVGKRIGYGRE-----SMAPHSLTFTMVGASL
Amt Azoarcus sp	GGTVVHINAGVAGLVGAYMVGKRIGFGRE-----ALTPHSLTFTMVGASM
T.denitrificans	GGTVVHINAGVAGLVGAIVLGKRIGYGRD-----AMPPHNLPMTMIGASL

*. *** .. *. :.* * . : * * . : * . : *

M6

M7



Polaromonas sp	LTVGWFGFNVMQAQTIDKISGLVAVNSLMAMVGGTLAALVFGKNDPG---
P.naphthalenivorans	LVVGWFGFNVMQAQTLDKISGLVAVNSLMAMVGGTLAALAFGKNDPG---
R.ferrireducens	LTVGWFGFNVMQAQTLDKISGLVAVNSLMAMVGGTLAALVAGKNDPG---
D.aromatica	LIVGWFGFNVMQAQTLDKISGLVALNSLMAMVGGTTLVALVAGKNDPG---
R.eutropha	LAVGWFGFNVMQAQTVDKISGLVAINSLMAMAGGTLAAWWAGRNDPG---
R.metallidurans	LAVGWFGFNVMQAQTVDKISGLVAINSLMAMAGGTLAAWWAGRNDPG---
AmtH H.seropedicae	LTVGWFGFNVMQAQTLDKMNLVAMNSLMAMAGGTTLVALLMGRNDPG---
Azoarcus sp	LTVGWFGFNVMQAQRDLAVNGLVAINSLMAMVGGTLAALAAGRNDPG---
M.capsulatus	LTVGWFGFNVMQAQNLNGISGLVAVNSLMAMVGGTLAALLAGRNDPG---
T.denitrificans	LTVGWFGFNVMQAQLIAAVSGLVAVNSLMAMVGGTLAALIVGRNDPG---
R.eutropha	LWFGWFGFNAGSALEANGSAALAFVNTLLATCAAVLSWTFGEWISKGKPS
R.metallidurans	LWFGWFGFNAGSALEANGSAALAFVNTLLATAAAVSVWTFGEWISKGKPS
AmtB H.seropedicae	LWFGWFGFNAGSGLEANGTAALAFVNTILATAAAVLSWSFGEWISKGKPS
D.aromatica	LWFGWFGFNAGSALEASGGAALAMVNTWVATACAALSWMFAEWILKGKPS
Amt-3 M.capsulatus	LWVGWFGFNAGSNLEATGTAALAFVNTMLATAAATLAWSAVEWIARGKPS
Polaromonas sp	LWVGWFGFNAGSALEANGFAALAFINTLGATAAAVLAWCVGESLMRGKAS
P.naphthalenivorans	LWVGWFGFNAGSALEANGFAALAFINTLGATAAAVLAWCVGEALLKGKAS
R.ferrireducens	LWVGWFGFNAGSALEANGFAALAFINTFGATAAAVLAWSVGEALMRGKAS
Amt Azoarcus sp	LWVGWFGFNAGSNLEATSGAALAFINTLVATAAAVLAWSLGEALFKGRPS
T.denitrificans	LWVGWFGFNAGSNLEATGGAALAFINTILATAAAGLAWMFAEWMVRGKPS

* .*****. * .*. :*: * . :

	M8	M9
Polaromonas sp	--FVHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPLGALVVGGVAGGVFVVMFTLTQNKWK	
P.naphthalenivorans	--FVHNGPLAGLIVAVCAGSDVMHPLGALVVGGVAGAVFVVMFTLTQNKWK	
R.ferrireduncens	--FVHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPLGALVVGGVAGALFVRMFTLTQNRWK	
D.aromatica	--FLHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPIGALVVGGVAGGLFVVMFTLVQNRWK	
R.eutropha	--FAYNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPVGALVTGAVAGVLFVHLFTLAQNKWH	
R.metallidurans	--FAYNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPLGALITGAVAGVLFVHLFTLAQNKWH	
AmtH H.seropedicae	--FAYNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPLGALVTGGIAGAFVVMFTTRTQNKWK	
Azoarcus sp	--FVHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPAGALAVGAVAGGLFVFLFTVAQNRWK	
M.capsulatus	--FVHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPIGALAVGAVAGFLFVYLFVLTQNRWK	
T.denitrificans	--FIHNGPLAGLIVAVCAGSDLMHPLGALATGAIAGALFVGMFTVTQNRWK	
R.eutropha	MLGGASGAVAGLVAITPAAGFVGPMSGIAIGLIAGLLCLWGVTGLKRMLG	
R.metallidurans	MLGGASGAVAGLVAITPAAGFVGPMSGIAMGLIAGLLCLWGVTGLKRLLG	
AmtB H.seropedicae	MLGAASGAVAGLVAITPAAGFVGVIGAVVMGLIAGLLCLWGVSGLKKILG	
D.aromatica	MLGAASGAVAGLVAITPAAGFVGVMSGIIIGLAGVVCVCLWGVNGLKLLG	
Amt-3 M.capsulatus	MLGGASGAVAGLVAITPACGFIGPMSGIVLGLAAGAVCFWSVTTKNALG	
Polaromonas sp	MLGAASGAVAGLVAITPAAGNVGIGGLVIGLAAGFACLVGNGLKLLG	
P.naphthalenivorans	MLGAASGAVAGLVAITPAAGNVGIAGGLAIGFIAGFACLVGVHGLKILG	
R.ferrireduncens	ILGAASGAVAGLVAITPAAGNVGVGALVIGTVAGFACLVGNGLKLLG	
Amt Azoarcus sp	MLGAASGAVAGLVAITPACGSVGPMSGIAIVIGLAGFVCLWGVNGLKRMLG	
T.denitrificans	LLGVASGVVAGLVAITPAAGLVGPMGGIVLGAVAGVVCVCLWGVSGLSALG	
	:: . * :*****: . . . : * . : * ** . . . :	

	M10
Polaromonas sp	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGSRALGGLG-----
P.naphthalenivorans	IDDVLGVWPLHGLCGTWGGIAAGIFGSKALGGLG-----
R.ferrireduncens	IDDVLGVWPLHGLCGTWGGIAAGIFGSQALGGLG-----
D.aromatica	IDDVLGVWPLHGMCGAWGGIAAGIFGSKAFGGAG-----
R.eutropha	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGSHALGGIG-----
R.metallidurans	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGSHALGGIG-----
AmtH H.seropedicae	IDDVLGVWPLHGLCGLWGGIAAGIFGLQALGGRG-----
Azoarcus sp	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGSTALGGLG-----
M.capsulatus	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGQALGGIG-----
T.denitrificans	IDDVLGVWPLHGLCGAWGGIAAGIFGAQALGGLG-----
R.eutropha	MDDSLDVFGVHGVGGILGALLTGVFASPSLGGTG-IYDYVAN--KVADDY
R.metallidurans	MDDSLDVFGVHGVGGILGALLTGVFAPSLGGTG-IYDYVAN--KVADDY
AmtB H.seropedicae	SDDALDVFGVHGVGGILGALLTGVFAPSLGGTG-IYDYVAN--AVAPDY
D.aromatica	ADDSLDVFGVHGVGGILGAMLTGVFADPALGGTG-VYDYVAN--AVGP-Y
Amt-3 M.capsulatus	YDDSLDVFGVHGVGGIIGALGTGIFASPALGGAG-VYDYVAN--AVAE-Y
Polaromonas sp	ADDSLDVFGVHGVGGILGALLTGVFNSPSLGGPGYVADWTTATMTVAADF
P.naphthalenivorans	ADDSLDVFGVHGVGGIVGALLTGVFNSPALGGPGYVADWVTAMVTTADY
R.ferrireduncens	ADDSLDVFGVHGVGGIVGALLTGVFNSPALGGPGYVADWVTATMTVSADY
Amt Azoarcus sp	ADDALDVFGVHGVGGILGALLTGVTAPSLGGTG-----AEDF
T.denitrificans	YDDSLDVFGVHGVGGIIGALGTGIFVSPTLGGVG-----VDGY
	** * . : : * : * * . : : * : : * * * :

	M11
Polaromonas sp	--GVSGLAQLIGSAMGVAWALLAGFVVYGTALKATLGLRLSQEEEFEGADL
P.naphthalenivorans	--GVSFGAQLIGTAMGVTTAALMGFVYVYALKLTLGLRLTQEEEFEGADR
R.ferrireduncens	--GVNLGAQLIGTAMGVAVAVAGGLLVYGGKAVMGLRLSQEEEFYNGADL
D.aromatica	--GIAFMPQLIMTLMAIAVALVGGTLVYVYALKATLGLRLDKEEEYEGADL
R.eutropha	--GVSGLAQLIGTLLGIVIAVAGGTIVYGTLLKLVGIRLDAEAEFNGADL
R.metallidurans	--GVSIVAQLIGTAMGIVIALVGGTVVYGTLLKVVGIRLDAEAEFNGADL
AmtH H.seropedicae	--GVSFSLQLIGSVMGIVIAALGGWIVYGLLKKAVGIRLDPEQEFEGADL
Azoarcus sp	--GVSFAAQAIGTLAGIVVALAGGTVVYGAIKATMGLRLDPEQEFAGADL
M.capsulatus	--GISFMAQVLGTGLGVAIALAGGLAVYGAATLIGLRLTPEEEFDGADL
T.denitrificans	--GVNLGAQLVGTLLGGVIALAGGALVYGALKLVGLRLDPEAEFTGADL
R.eutropha	SIAGQVWIQFQGVLTITIVWSGVVAFVAYKLVDMGLIGLRVPEEEEREGLDI
R.metallidurans	SIAGQVWIQFEGVLTITIVWSGVVALVAYKLIDMLIGLRVPEEEEREGLDI
AmtB H.seropedicae	SIGGQVWIQFQGVLTITIVWSGVVSFIAYKIVDVVIGLRVTEEEEREGLDI
D.aromatica	DMTAQLISQAWGVGTIVVWSGVVSIVAYKLVDIVIGLRVPEEEEREGLDL
Amt-3 M.capsulatus	DMVSQVISQSWGVTIVVWSGVVSLIAYKIVDLLVGLRVSEETEREGLDI
Polaromonas sp	SVVSQVLIQAKAVLITIVWSGVVSFIAYKIVDLTIGLRVSEEDEREGLDI
P.naphthalenivorans	SIMSQVWIQAKAVLITIVWSGVVSLVAYKIVDLTIGLRVSEEDEREGLDI
R.ferrireduncens	SIASQVWIQAKAVLTTIVWSGVVSFVAYKIVDLTIGLRVSEEDEREGLDI
Amt Azoarcus sp	SIAGQVWIQTVSVLITIAWSAVVAVIAYKVADILVGLRVPEEEERQGLDV
T.denitrificans	TLAQVMTQASGLVITIVWSAVVSFVAFKLIDVTLGLRVAAEQEREGLDT
	: . * : : . . : . : * * * *

Polaromonas sp	SIHRIGATPDREVNW
P.naphthalenivorans	SIHRIGATPEHEVNW
R.ferrireducens	SIHMISATAEREVNW
D.aromatica	SIHRITATPEREPNW
R.eutropha	TLHRISATPERETNW
R.metallidurans	TLHRISATPERETSW
AmtH H.seropedicae	AIHKISSTAERETSW
Azoarcus sp	SLHRISATAERETSW
M.capsulatus	TLHRISSSPEKEAGW
T.denitrificans	SIHKVSATAERETNW
R.eutropha	TSHGETAYEV-----
R.metallidurans	TSHGETAYEV-----
AmtB H.seropedicae	SSHGESAYH-----
D.aromatica	TSHGETAYHH-----
Amt-3 M.capsulatus	REHGETAYHP-----
Polaromonas sp	TAHGETAYNR-----
P.naphthalenivorans	TAHGETAYNR-----
R.ferrireducens	TSHGETAYSN-----
Amt Azoarcus sp	SAHGETAYHH-----
T.denitrificans	ASHGERAYSV-----
	* :

Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos em todas as proteínas comparadas, enquanto os pontos indicam substituições de aminoácidos do mesmo grupo. Os traços nas seqüências indicam espaços criados pelo programa ClustalW a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as seqüências. As proteínas Amt analisadas foram separadas em dois grupos. As destacadas em cinza são aquelas similares a AmtH e as não destacadas são similares a AmtB. Os resíduos marcados em azul são aqueles envolvidos na estabilização de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ durante o transporte (KHADEMI et al., 2004). O motivo conservado D-[FYWS]-A-G-[GSC]-x(2)-[IV]-x(3)-[SAG](2)-x(2)-[SAG]-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFYWA](2)-x-[GK]-x-R está em itálico. Os prováveis domínios transmembrana das proteínas analisadas estão marcados com hélices acima das seqüências. As prováveis seqüências sinais de exportação para o espaço periplasmático das proteínas AmtB e AmtH de *H. seropedicae* estão sublinhados. M1 a M11 – hélices transmembrana.

Proteínas similares a AmtH:

Polaromonas sp - *Polaromonas* sp (YP_551665)
P.naphthalenivorans - *Polaromonas naphthalenivorans* (ZP_01020798)
R.ferrireducens - *Rhodospirillum rubrum* (YP_521802)
D.aromatica - *Dechloromonas aromatica* (YP_286902)
R.eutropha - *Ralstonia eutropha* (YP_298238)
R.metallidurans - *Ralstonia metallidurans* (EAN52385)
AmtH H.seropedicae - *Herbaspirillum seropedicae* AmtH
Azoarcus sp - *Azoarcus* sp (YP_159637)
M.capsulatus - *Methylococcus capsulatus* (YP_114031)
T.denitrificans - *Thiobacillus denitrificans* (YP_315459)

Proteínas similares a AmtB:

R.eutropha - *Ralstonia eutropha* (YP_294518)
R.metallidurans - *Ralstonia metallidurans* (ZP_00594285)
AmtB H.seropedicae - *Herbaspirillum seropedicae* AmtB (AAZ43076)
D.aromatica - *Dechloromonas aromatica* (YP_283283)
Amt-3 M.capsulatus - *Methylococcus capsulatus* Amt-3 (YP_114562)
Polaromonas sp - *Polaromonas* sp (YP_547047)
P.naphthalenivorans - *Polaromonas naphthalenivorans* (ZP_01023021)
R.ferrireducens - *Rhodoferrax ferrireducens* (YP_521756)
Amt Azoarcus sp - *Azoarcus* sp Amt (CAI07893)
T.denitrificans - *Thiobacillus denitrificans* (YP_313999)

TABELA 3 – EXPRESSÃO DAS FUSÕES *orf1::lacZ*, *glnK::lacZ* E *amtB::lacZ* EM *H. seropedicae*

Condições	Atividade de β -galactosidase [nmol <i>o</i> -nitrofenol/(min.mg proteína)]					
	Plasmídeos					
	nenhum	pMP220	pPW452	pMPporf1 (<i>orf1::lacZ</i>)	pPWpglnK (<i>glnK::lacZ</i>)	pPWpamtB (<i>amtB::lacZ</i>)
5 mmol/L glutamato	27 \pm 2	75 \pm 13	47 \pm 4	19983 \pm 1107	231 \pm 44	19 \pm 4
2 mmol/L NH ₄ Cl	18 \pm 11	69 \pm 12	22 \pm 13	21000 \pm 1346	239 \pm 21	25 \pm 9
20 mmol/L NH ₄ Cl	17 \pm 3	61 \pm 3	44 \pm 9	966 \pm 155	183 \pm 34	27 \pm 5

A atividade de β -galactosidade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos item 3.27 e está expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min.mg proteína). As células foram crescidas em meio NFbHP-malato líquido acrescido de 5 mmol/L de glutamato, 2 mmol/L ou 20 mol/L de cloreto de amônio. Os valores representam a média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes.

4.3 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

4.3.1 Obtenção da estirpe mutante *amtB* de *H. seropedicae*

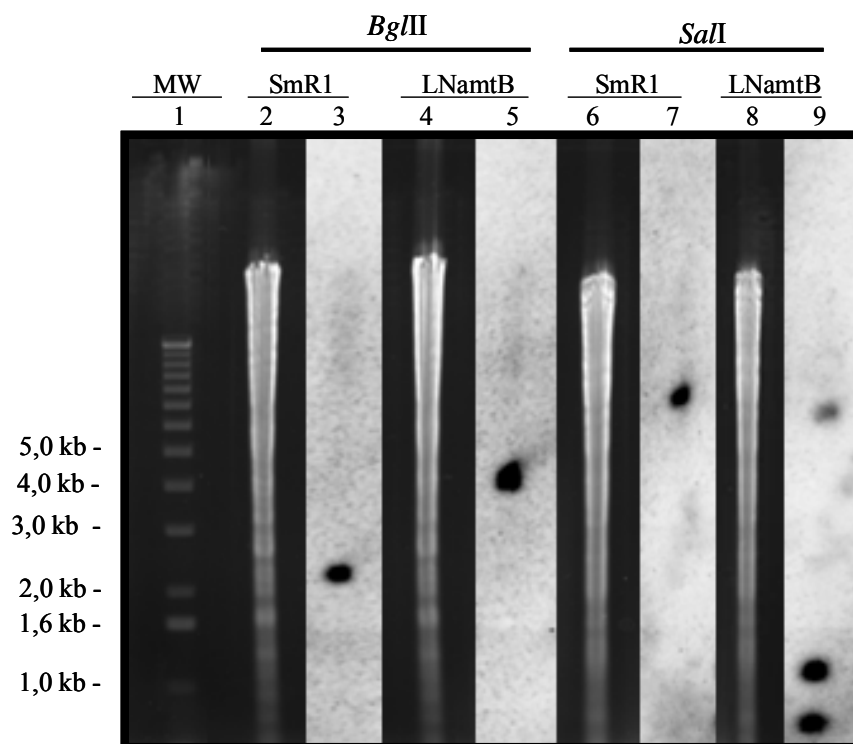
Para a obtenção da estirpe mutante *amtB* de *H. seropedicae* (Material e Métodos, item 3.13), o plasmídeo pSUPamtBCTc que contém a parte central do gene *amtB* mutado por um transposon Tc^R, foi introduzido em *H. seropedicae* SmR1 por conjugação. Uma colônia, denominada LNamtBTc, onde a integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla, foi selecionada. A posição da inserção do cassete Tc^R no genoma da bactéria foi determinada por hibridização do DNA genômico. A estirpe obtida foi denominada LNamtBTc.

As estirpes SmR1 e LNamtBTc tiveram seu DNA genômico purificado e digerido com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Sal*I para hibridização com o plasmídeo pSUPamtBCTc digerido com a enzima *Sal*I. Os perfis de hibridização das estirpes selvagem e mutante estão mostrados na figura 18. A figura 19 mostra um esquema da recombinação ocorrida no genoma de *H. seropedicae* e a origem das bandas hibridizadas.

Quando digerido com a enzima *Bgl*II o DNA genômico da estirpe selvagem apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 2,3 kb onde está localizado o gene *amtB*. Já a estirpe mutante apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 4,0 kb onde está localizado o gene *amtB* mais o cassete Tc^R (figuras 18 e 19).

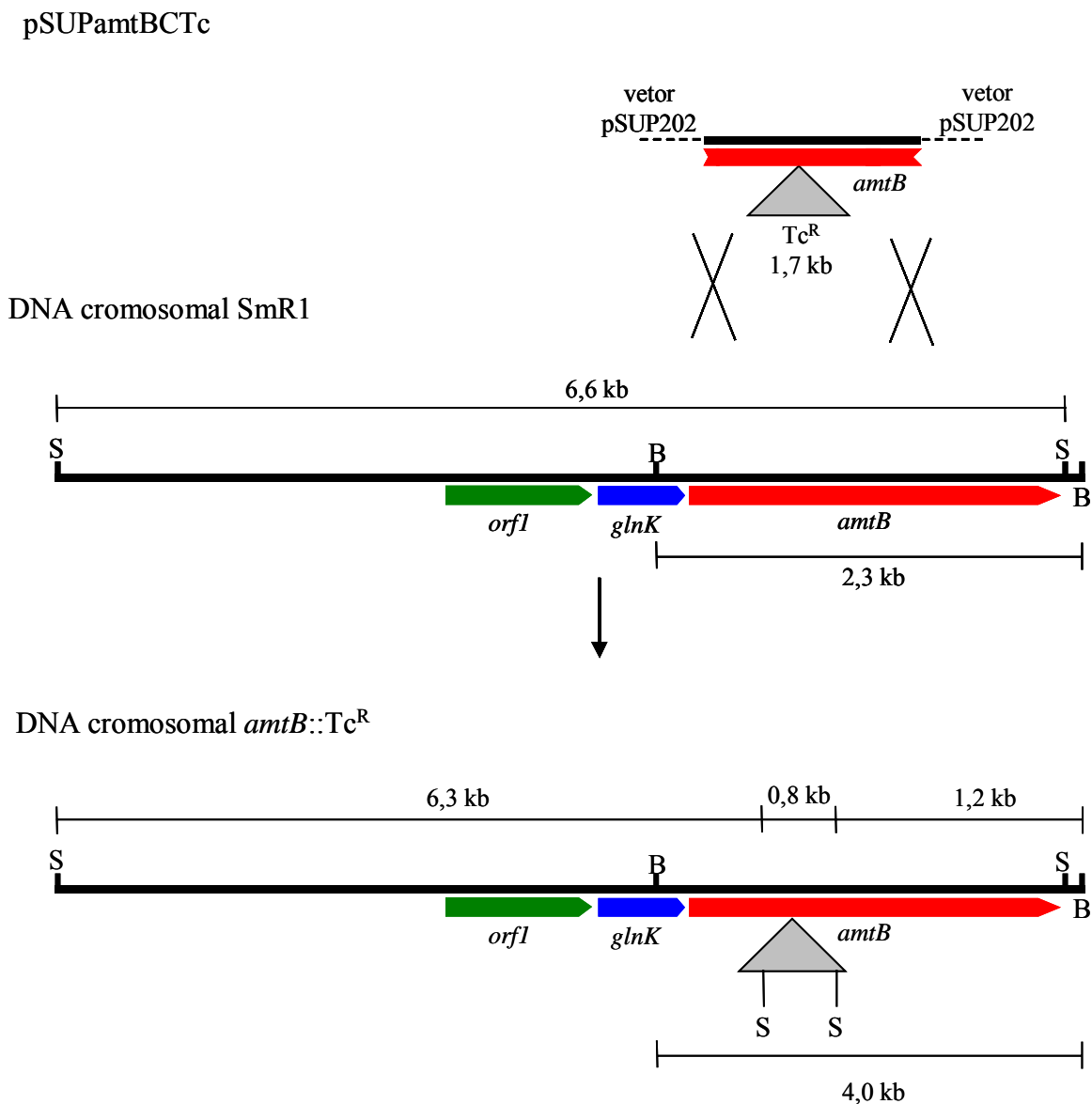
Quando digerido com a enzima *Sal*I o DNA genômico da estirpe selvagem apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento *Sal*I de 6,6 kb onde está localizado o operon *orfIglNkamtB* (figuras 18 e 19). Já o DNA da estirpe mutante apresentou sinais de hibridização correspondentes às bandas de 0,8 kb (parte do transposon EZ:ENTM<TET-1>), 6,3 kb e 1,2 kb (figuras 18 e 19).

FIGURA 18 – HIBRIDIZAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES SmR1 E LNamtB DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO pSUPamtBCTc



As linhas 2, 4, 6 e 8 mostram a separação eletroforética das amostras de DNA em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3, 5, 7 e 9 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pSUPamtBCTc. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de tamanho molecular 1 kb ladder; as linhas 2, 3, 6 e 7 correspondem a estirpe selvagem SmR1 e as linhas 4, 5, 8 e 9 correspondem a estirpe LNamtB. As linhas 2 e 4 foram obtidas após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Bgl*III e as linhas 6 e 8 foram obtidas após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Sal*I.

FIGURA 19 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA PARA PRODUZIR A ESTIRPE L_{NamtB} DE *H. seropedicae*



Para a obtenção do mutante *amtB* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUPamtBCTc, que contém a parte central do gene *amtB* mutado pelo transposon EZ::TNTM<TET-1> (Epicentre), foi introduzido em *H. seropedicae* SmR1 por conjugação. Uma colônia, denominada L_{NamtBTc}, onde a integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla, foi selecionada. B - sítio de restrição *Bgl*II; S - sítio de restrição *Sal*I.

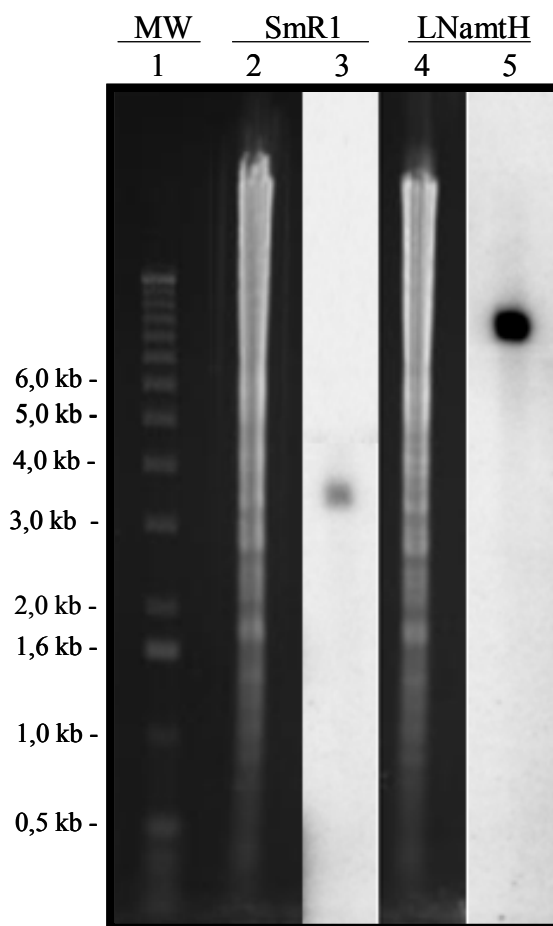
4.3.2 Mutagênese do gene *amtH* de *H. seropedicae*

Para a obtenção do mutante *amtH* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUPamtHClacZ (Material e Métodos, item 3.14.1) foi transferido por conjugação para a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. Uma colônia, denominada LNamtH, resultante de recombinação homóloga dupla, foi selecionada.

A inserção do cassete *lacZ*-Km^R no gene *amtH* da bactéria foi confirmada por hibridização. A estirpe selvagem SmR1 e a estirpe mutante LNamtH tiveram seu DNA genômico purificado, digerido com a enzima de restrição *Bgl*II e hibridizado com o plasmídeo pSUPamtHClacZ digerido com a enzima *Sal*I. O perfil de hibridização das estirpes selvagem e mutante está mostrado na figura 20. A figura 21 mostra um esquema da recombinação ocorrida no genoma de *H. seropedicae* e a origem das bandas hibridizadas.

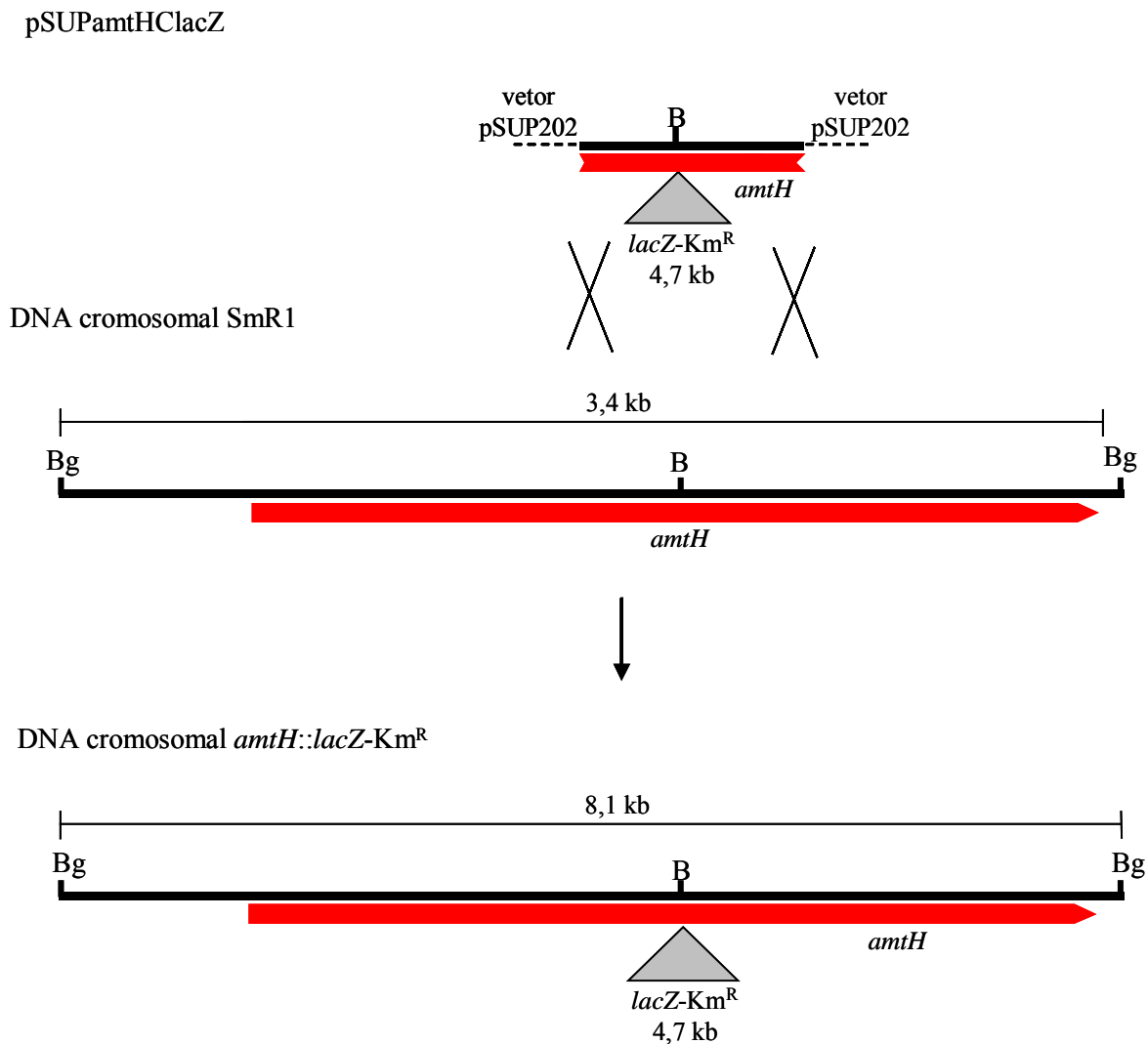
Quando digerido com a enzima *Bgl*II o DNA genômico da estirpe selvagem apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 3,4 kb onde está localizado o gene *amtH*. Já a estirpe mutante apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 8,1 kb onde está localizado o gene *amtH* mais o cassete *lacZ*-Km^R inserido (figuras 20 e 21).

FIGURA 20 – HIBRIDIZAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES SmR1 E LNamtH DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO pSUPamthClacZ



As linhas 2 e 4 mostram a separação eletroforética do DNA genômico de *H. seropedicae* em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3 e 5 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pSUPamthClacZ. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de tamanho molecular 1 kb ladder; as linhas 2 e 3 correspondem a estirpe selvagem SmR1 e as linhas 4 e 5 correspondem a estirpe LNamtH. O DNA apresentado foi obtido após digestão com a enzima de restrição *Bgl*III.

FIGURA 21 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA NA ESTIRPE LNamtH DE *H. seropedicae*



Para a obtenção do mutante *amtH* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUPamtHClacZ que contém um cassete *lacZ-Km^R* inserido no gene *amtH* deste organismo, foi introduzido na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* por conjugação. A integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla. Bg - sítio de restrição *Bgl*II; B - sítio de restrição *Bam*HI.

4.3.3 Construção do duplo mutante *amtBamtH* de *H. seropedicae*

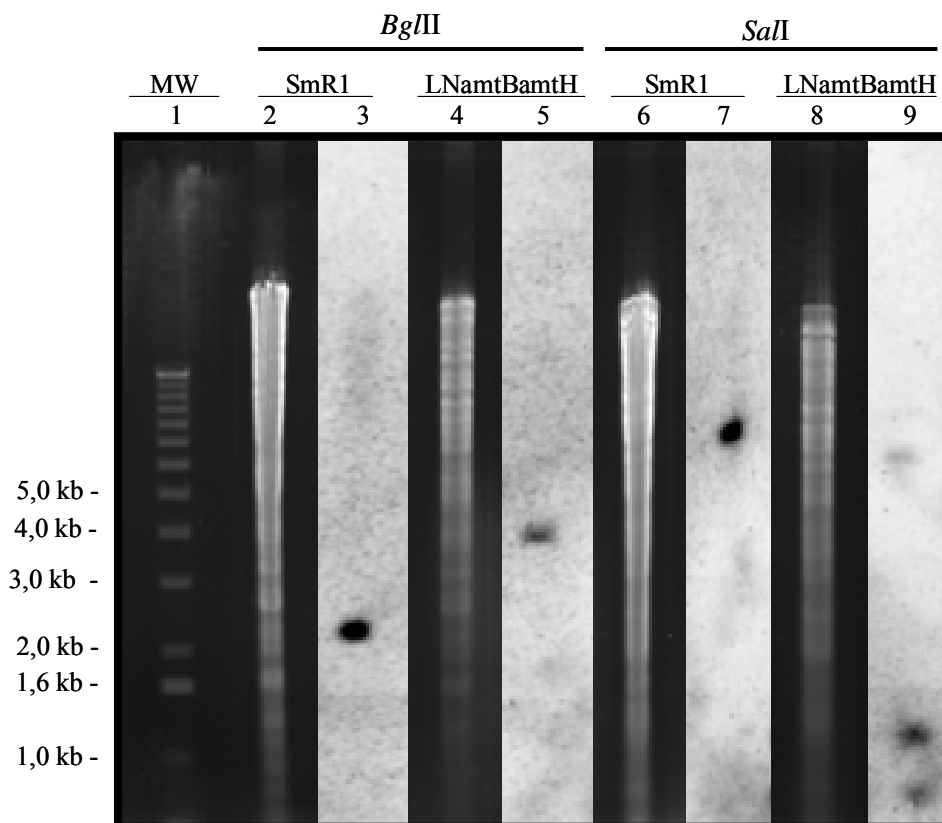
Para a obtenção do duplo mutante *amtBamtH* de *H. seropedicae*, o plasmídeo pSUPamtBTc, que contém um cassete Tc^R inserido no gene *amtB* deste organismo, foi introduzido por conjugação na estirpe LNamtH (*amtH::lacZ-Km^R*). Por recombinação homóloga dupla, houve a inserção deste cassete no genoma da estirpe LNamtH, originando o duplo mutante *amtH::lacZ-Km^R/amtB::Tc^R*. Esta estirpe mutante foi denominada LNamtBamtH. A interrupção dos genes *amtB* e *amtH* nesta estirpe foi confirmada por hibridização de maneira semelhante à descrita para os mutantes LNamtBTc e LNamtH (itens 4.3 e 4.6). O perfil de hibridização das estirpes selvagem e mutante está mostrado nas figuras 22 e 23. As figuras 19 e 21 mostram um esquema da recombinação ocorrida no genoma de *H. seropedicae* e a origem das bandas hibridizadas.

4.3.4 Construção das estirpes mutantes *glnK* de *H. seropedicae*

4.3.4.1 Amplificação e clonagem do gene *glnK* completo de *H. seropedicae*

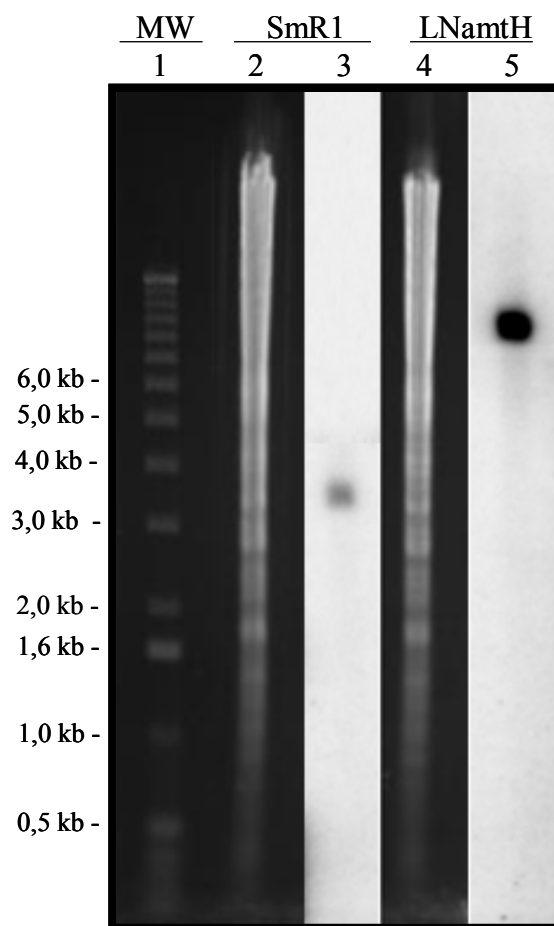
Para a clonagem do gene *glnK* completo de *H. seropedicae* foram construídos oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência dos genes *glnK* e *amtB* deste organismo (NOINDORF, 2002). Estes oligonucleotídeos iniciadores, denominados glnKD e glnKR, foram utilizados numa reação de PCR que tinha como molde o DNA genômico de *H. seropedicae* estirpe SmR1 (Material e Métodos, item 3.16.1.1). O produto de amplificação obtido a partir desta reação apresentou aproximadamente 960 pb contendo o gene *glnK* completo e parte do gene *amtB* e foi clonado no vetor pTZ18R, originando o plasmídeo pLN_{glnK}.

FIGURA 22 – HIBRIDIZAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES SmR1 E L_{NamtBamtH} DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO pSUPamtBCTc



As linhas 2, 4, 6 e 8 mostram a separação eletroforética das amostras de DNA em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3, 5, 7 e 9 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pSUPamtBCTc. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de tamanho molecular 1 kb ladder; as linhas 2, 3, 6 e 7 correspondem a estirpe selvagem SmR1 e as linhas 4, 5, 8 e 9 correspondem a estirpe L_{NamtBamtH}. As linhas 2 e 4 foram obtidas após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Bgl*III e as linhas 6 e 8 foram obtidas após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Sal*I.

FIGURA 23 – HIBRIDIZAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES SmR1 E LNamtBamtH DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO pSUPamTHClacZ



As linhas 2 e 4 mostram a separação eletroforética do DNA genômico de *H. seropedicae* em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3 e 5 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pSUPamTHClacZ. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de tamanho molecular 1 kb ladder; as linhas 2 e 3 correspondem a estirpe selvagem SmR1 e as linhas 4 e 5 correspondem a estirpe LNamtBamtH. O DNA apresentado foi obtido após digestão com enzima de restrição *Bgl*II.

4.3.4.2 Obtenção do mutante *glnK::sacB-Km^R*

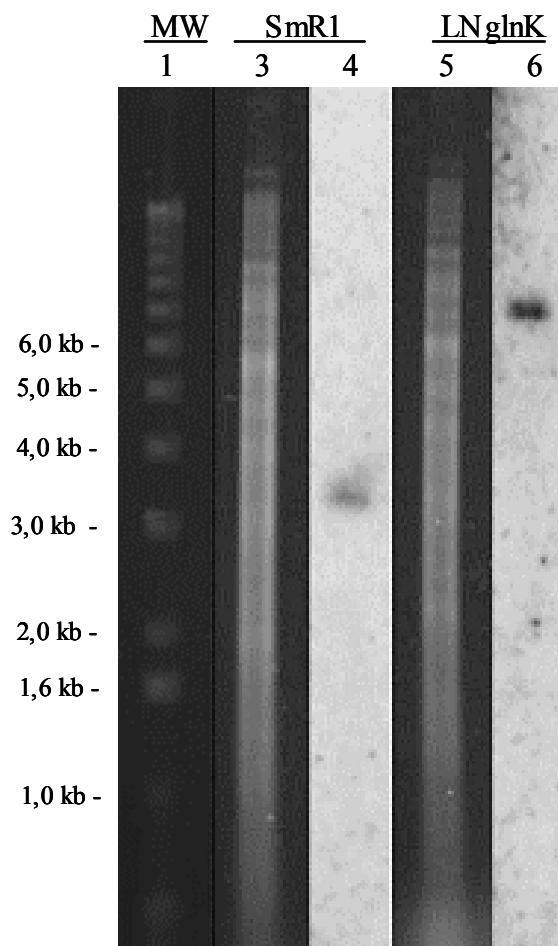
Para a obtenção do mutante *glnK* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUPglnKsacB, que contém um cassete *sacB-Km^R* inserido no gene *glnK* clonado no vetor pSUP202 (Material e Métodos, item 3.16.1.2) foi utilizado para transformar *E. coli* S17.1 e posteriormente transferido por conjugação para a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* como descrito em Material e Métodos (item 3.10).

Diversas colônias resistentes a canamicina foram selecionadas. Aquelas em que a inserção do cassete *sacB-Km^R* ocorreu por recombinação homóloga dupla foram selecionadas através da sensibilidade ao antibiótico cloranfenicol (marca do vetor pSUP202). O mutante *glnK::sacB-Km^R* foi denominado LNglnK.

A estirpe selvagem SmR1 e a estirpe mutante LNglnK tiveram seu DNA genômico purificado, digerido com a enzima de restrição *NcoI* e hibridizado com o plasmídeo pSUPglnKsacB digerido com a enzima *SalI*. Os perfis de hibridização das estirpes selvagem e mutante estão mostrados na figura 24. A figura 25 mostra um esquema da recombinação ocorrida no genoma de *H. seropedicae* e a origem das bandas hibridizadas.

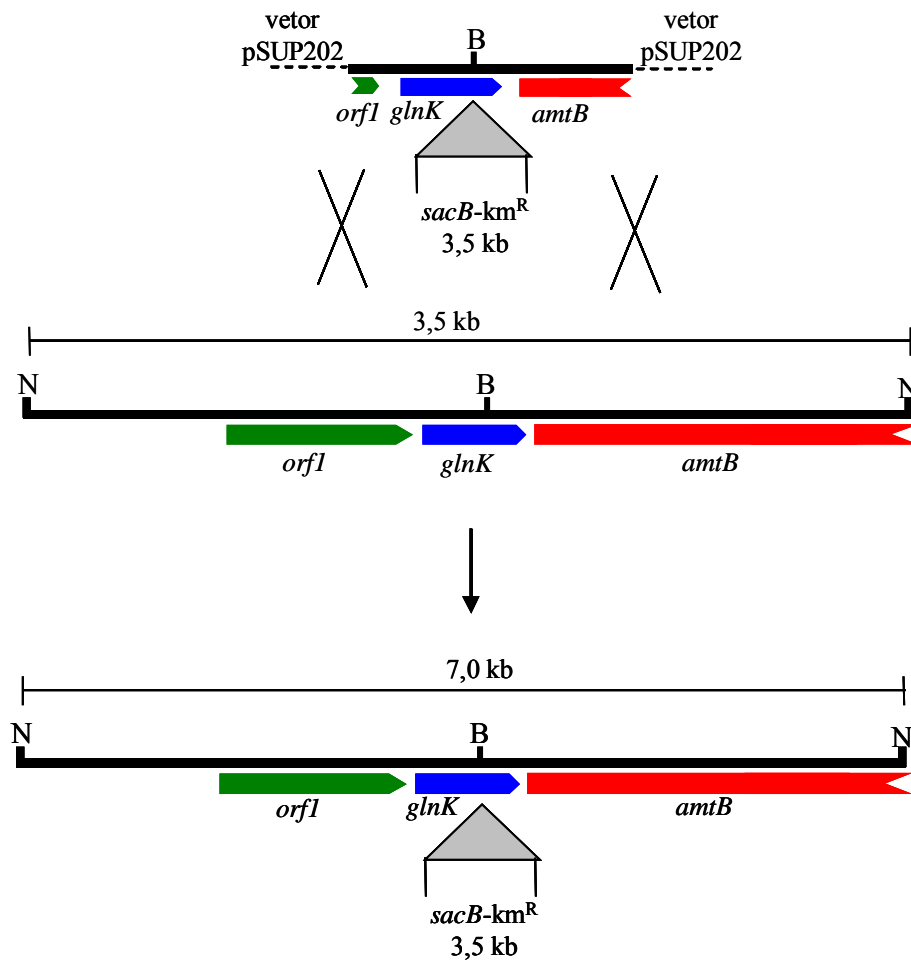
Quando digerido com a enzima *NcoI* o DNA genômico da estirpe selvagem apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 3,5 kb onde está localizado o gene *glnK*. Já a estirpe mutante apresentou um sinal de hibridização referente ao fragmento de 7,0 kb correspondente ao gene *glnK* mais o cassete *sacB-Km^R* (figuras 24 e 25).

FIGURA 24 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DA ESTIRPE LN_{glnK} DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO pSUP_{glnK}sacB



As linhas 2 e 4 mostram a separação eletroforética das amostras de DNA em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3 e 5 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pSUP_{glnK}sacB. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de massa molecular 1 kb ladder; as linhas 2 e 3 correspondem a estirpe selvagem SmR1 digerida com enzima de restrição *NcoI* e as linhas 4 e 5 correspondem a estirpe LN_{NamtB} digerida com a mesma enzima.

FIGURA 25 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA NA CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE LN_{glnK} DE *H. seropedicae*



Para a obtenção do mutante *glnK* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUP_{glnK}sacB, que contém um cassete *sacB-Km^R* inserido no gene *glnK* clonado no vetor pSUP202 foi utilizado para transformar *E. coli* S17.1 e posteriormente transferido por conjugação para a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. A integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla. N - sítio de restrição *Nco*I; B - sítio de restrição *Bgl*III.

4.3.4.3 Obtenção da estirpe mutante *glnKdel*

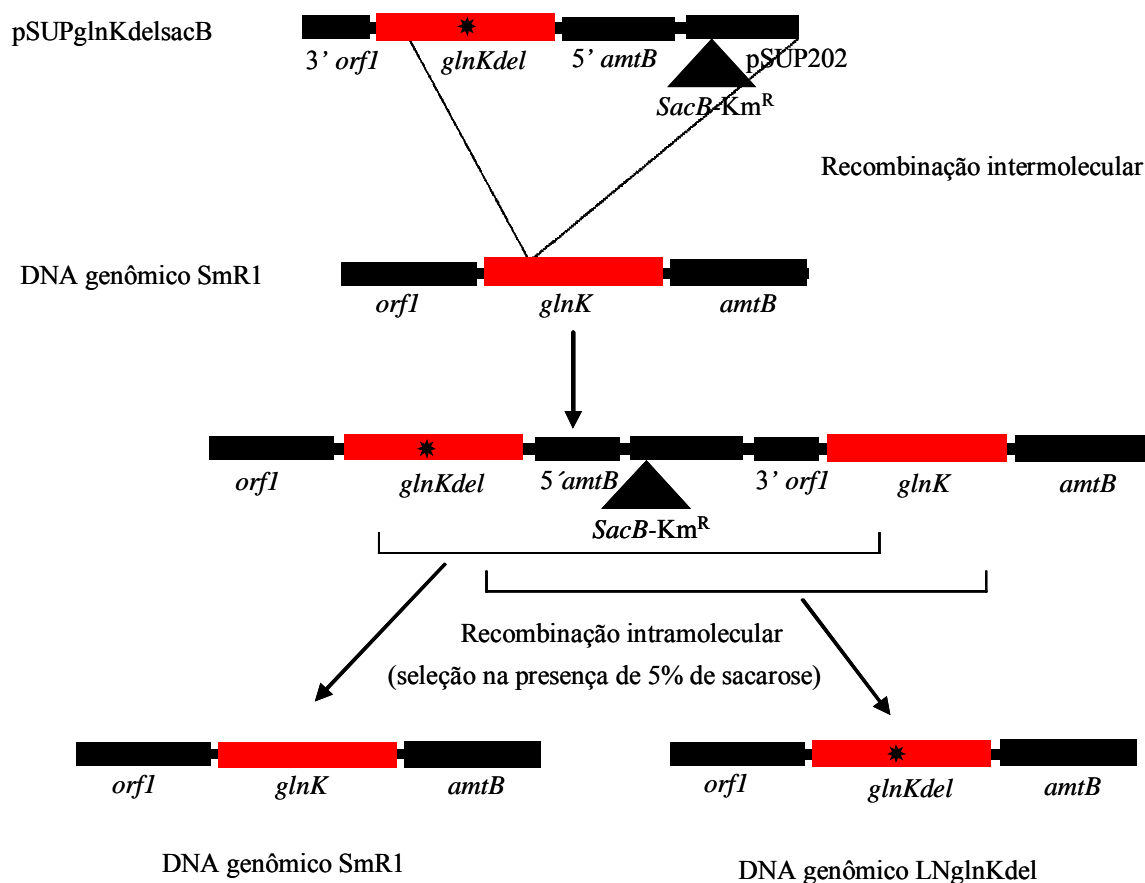
Em *H. seropedicae* o gene *glnK* é co-transcrito com os genes *orf1* e *amtB*. A mutagênese do gene *glnK* através da inserção de um cassete de DNA, influenciaria a transcrição do gene *amtB* (localizado a jusante do gene *glnK*), devido à presença de seqüências promotoras e terminadores de transcrição neste cassete. Para evitar este problema, a mutagênese do gene *glnK* foi realizada através da técnica da deleção em fase, na qual parte do gene *glnK* foi retirado de forma a manter a fase de leitura deste gene.

Para a deleção *in vitro* do gene *glnK* de *H. seropedicae* foram construídos oligonucleotídeos baseados na seqüência do operon *orf1glnKamtB* deste organismo (NOINDORF, 2002). Estes oligonucleotídeos, denominados GlnKdelD e GlnKdelR, foram utilizados juntamente com os oligonucleotídeos reverso e universal, respectivamente, em reações de PCR que apresentavam como molde o plasmídeo pUCG08del (Material e Métodos, item 3.16.2.1). Os oligonucleotídeos reverso e universal se alinham na extremidade do sítio de policlonagem do vetor pUC18. Os oligonucleotídeos GlnKdelD e GlnKdelR têm seus sítios de reconhecimento localizados dentro do gene *glnK* de *H. seropedicae* (figura 9).

Os produtos amplificados nas reações de PCR com os oligonucleotídeos GlnKdelR e universal e GlnKdelD e reverso foram digeridos com a enzima *XhoI* e ligados entre si. Esta ligação foi utilizada como molde para uma reação de PCR com os oligonucleotídeos universal e reverso (figura 9). O fragmento de DNA amplificado apresentava aproximadamente 600 pb. Parte deste fragmento (aproximadamente 500 pb) foi clonado no vetor pUC18, originando o plasmídeo pUCglnKdel e, posteriormente, subclonado no vetor pSUP202, originando o plasmídeo pSUPglnKdel. Cento e noventa e dois nucleotídeos (64 aminoácidos – resíduos 34 a 98) foram deletados do gene *glnK* de *H. seropedicae*, que apresenta originalmente 112 aminoácidos.

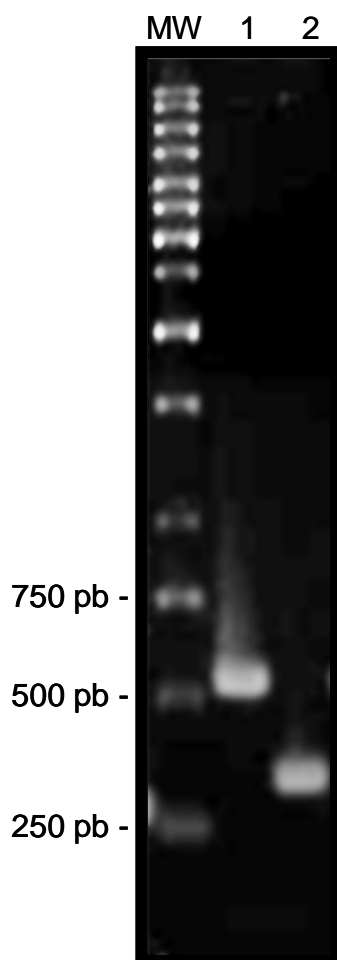
Para a construção do mutante *glnKdel* de *H. seropedicae*, um cassete *sacB-Km^R* foi inserido no plasmídeo pSUPglnKdel, originando o plasmídeo pSUPglnKdelsacB. Este foi introduzido por conjugação em *H. seropedicae* estirpe SmR1. Uma colônia, apresentando resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol, resultado de recombinação homóloga simples, foi selecionada e cultivada durante a noite em meio NFbHPN-malato na presença apenas do antibiótico estreptomicina. Como esta estirpe apresentava uma cópia selvagem e uma cópia deletada do gene *glnK*, uma segunda recombinação homóloga, entre as duas cópias presentes no genoma, levaria a formação de duas possíveis estirpes: contendo o gene *glnK* selvagem ou contendo o gene *glnK* deletado (figura 26). Nas estirpes onde esta segunda recombinação homóloga ocorreu houve a perda do cassete *sacB-Km^R* sendo, portanto, sensíveis ao antibiótico canamicina. Como o produto do gene *sacB* é tóxico para bactérias gram-negativas quando crescidas na presença de sacarose, apenas aquelas que perderam este gene são capazes de crescer na presença deste carboidrato. Assim, a seleção destas estirpes foi feita por resistência a sacarose e sensibilidade a canamicina. Seis colônias foram selecionadas. Estas foram analisadas por PCR para verificar a presença da deleção no gene *glnK*. Como iniciadores para estas reações foram utilizados os oligonucleotídeos GlnKF1 e GlnKR1 que se anelam na extremidade 3' do gene *orf1* e na extremidade 5' do gene *amtB* de *H. seropedicae*, respectivamente (Material e Métodos, item 3.17.1). O produto de amplificação por PCR utilizando DNA genômico das estirpes isoladas que possuíam o gene *glnK* selvagem apresentou 532 pb e daquelas que possuíam o gene *glnK* deletado apresentou 340 pb (figura 27). Esta deleção foi confirmada através do sequenciamento dos produtos de amplificação obtidos (dados não apresentados). A estirpe apresentando o gene *glnK* deletado foi denominada LNglnKdel.

FIGURA 26 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA NA ESTIRPE LN*glnKdel* DE *H. seropedicae*



O plasmídeo pSUPglnKdelSacB, que contém o gene *glnK* de *H. seropedicae* com uma deleção de 192 nucleotídeos foi introduzido por conjugação em *H. seropedicae* estirpe SmR1. Uma estirpe mutante resultante de recombinação homóloga simples foi isolada na presença de sacarose. Como o produto do gene *sacB* é tóxico para bactérias gram-negativas quando estas são crescidas na sua presença, apenas as que perderam este gene, por recombinação homóloga intramolecular, foram capazes de crescer. Esta recombinação leva a formação de duas configurações genômicas: uma contendo o gene *glnK* selvagem e outra contendo o gene *glnK* deletado. A deleção no gene *glnK* foi detectada por PCR

FIGURA 27 - PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR OBTIDO DO DNA GENÔMICO DE *H. seropedicae* UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GlnKF1 E GlnKR1



Separação eletroforética das amostras de DNA em gel de agarose 2 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. A imagem foi obtida em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics).

MW – padrão de tamanho molecular

1 – Produto de amplificação obtido do DNA genômico da estirpe resultante de recombinação intramolecular onde ocorreu a reconstituição do gene *glnK*

2 – Produto de amplificação obtido do DNA genômico da estirpe LNglnKdel

O mutante LN $glnK$ ($glnK::sacB-Km^R$) foi construído para posterior utilização na construção de uma estirpe mutante contendo uma deleção em fase no gene $glnK$. Para a obtenção desta estirpe, o plasmídeo pSUP $glnKdel$, que contém uma deleção em fase do gene $glnK$ (Material e Métodos item 3.16.2.1) foi transferido por conjugação para a estirpe LN $glnK$ de *H. seropedicae*. As colônias resultantes de recombinação homóloga dupla, perderiam parte do gene $glnK$ juntamente com o cassete $sacB-Km^R$, e seriam, portanto, resistentes a sacarose e sensíveis a canamicina. Várias colônias resistentes à sacarose foram obtidas, porém nenhuma delas apresentava sensibilidade a canamicina. Além disso, todas as colônias analisadas eram resistentes ao cloranfenicol, indicando que estas eram resultantes de recombinação homóloga simples. Este método não se mostrou, portanto, eficiente para a construção de estirpes mutantes contendo deleção em fase do genoma em *H. seropedicae*.

4.3.5 Construção do mutante *orf1* de *H. seropedicae*

Para a construção do mutante *orf1del* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUP $orf1delsacB$ (Material e Métodos item 3.17.1), que contém o gene *orf1* de *H. seropedicae* apresentando uma deleção em fase dos aminoácidos 83 a 176 e um cassete $sacB-Km^R$ clonado no vetor pSUP202 foi introduzido por conjugação em *H. seropedicae* estirpe SmR1. Uma colônia, apresentando resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol foi crescida durante a noite em meio NFbHPN-malato na presença do antibiótico estreptomicina e posteriormente selecionada em meio contendo sacarose. Seis colônias apresentando resistência à sacarose e sensibilidade à canamicina foram selecionadas e analisadas por PCR para verificar a presença da deleção no gene *orf1*. Como iniciadores para as reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos *orf1F* e *orf1R* que se anelam nas extremidades do gene *orf1* de *H. seropedicae* (Material e Métodos, item 3.17.1). O produto de amplificação das estirpes que possuem o gene *orf1* selvagem apresentou 554 pb e daquelas que possuem o gene *orf1* deletado apresentou 275 pb (figura 28). Esta deleção foi confirmada através do sequenciamento dos produtos de amplificação obtidos (dados não apresentados). A estirpe contendo o gene *orf1* deletado foi denominada LN $orf1del$.

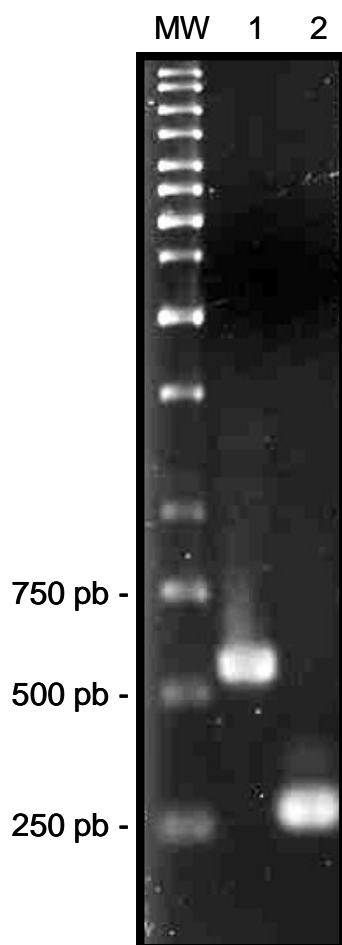
4.3.6 Construção do mutante *glnB* de *H. seropedicae*

Para a obtenção do mutante *glnB* de *H. seropedicae* o plasmídeo pACB194 (BONATTO, A. C.) que contém um cassete de tetraciclina inserido no gene *glnB* deste organismo, foi introduzido na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* por conjugação. Uma colônia contendo a inserção do transposon Tc^R no gene *glnB* de *H. seropedicae* por recombinação homóloga dupla foi selecionada. A inserção do cassete Tc^R no genoma da bactéria foi confirmada por hibridização. A estirpe obtida foi denominada LNglnB.

O DNA genômico das estirpes SmR1 e LNglnB foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Bgl*II para hibridização com o plasmídeo pACB194 digerido com a enzima *Sal*I. O perfil de hibridização do selvagem e da estirpe mutante está mostrado na figura 29. A figura 30 mostra um esquema da recombinação ocorrida no genoma de *H. seropedicae* e a origem das bandas hibridizadas.

Quando digerido com a enzima *Bgl*II o DNA genômico da estirpe selvagem apresentou sinais de hibridização referentes aos fragmentos de 1,9 kb (onde está localizado o gene *glnB*) e 2,8 kb. Já a estirpe mutante apresentou sinais de hibridização referente ao fragmento de 2,8 kb e 3,6 kb. Este último contém parte do gene *glnB* e o cassete Tc^R (figuras 29 e 30).

FIGURA 28 - PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR OBTIDO DO DNA GENÔMICO DE *H. seropedicae* UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES Orf1F E Orf1R

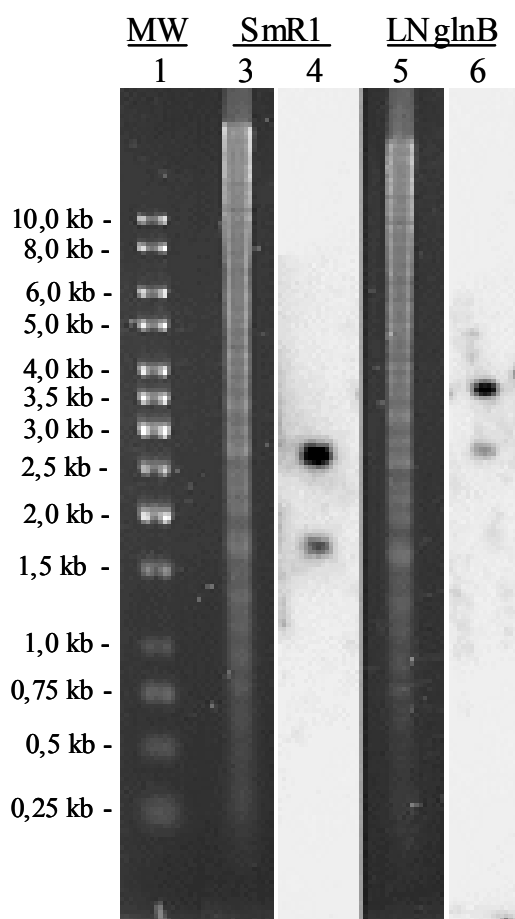


Separação eletroforética das amostras de DNA em gel de agarose 2 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. A imagem foi obtida em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics).

MW – padrão de tamanho molecular

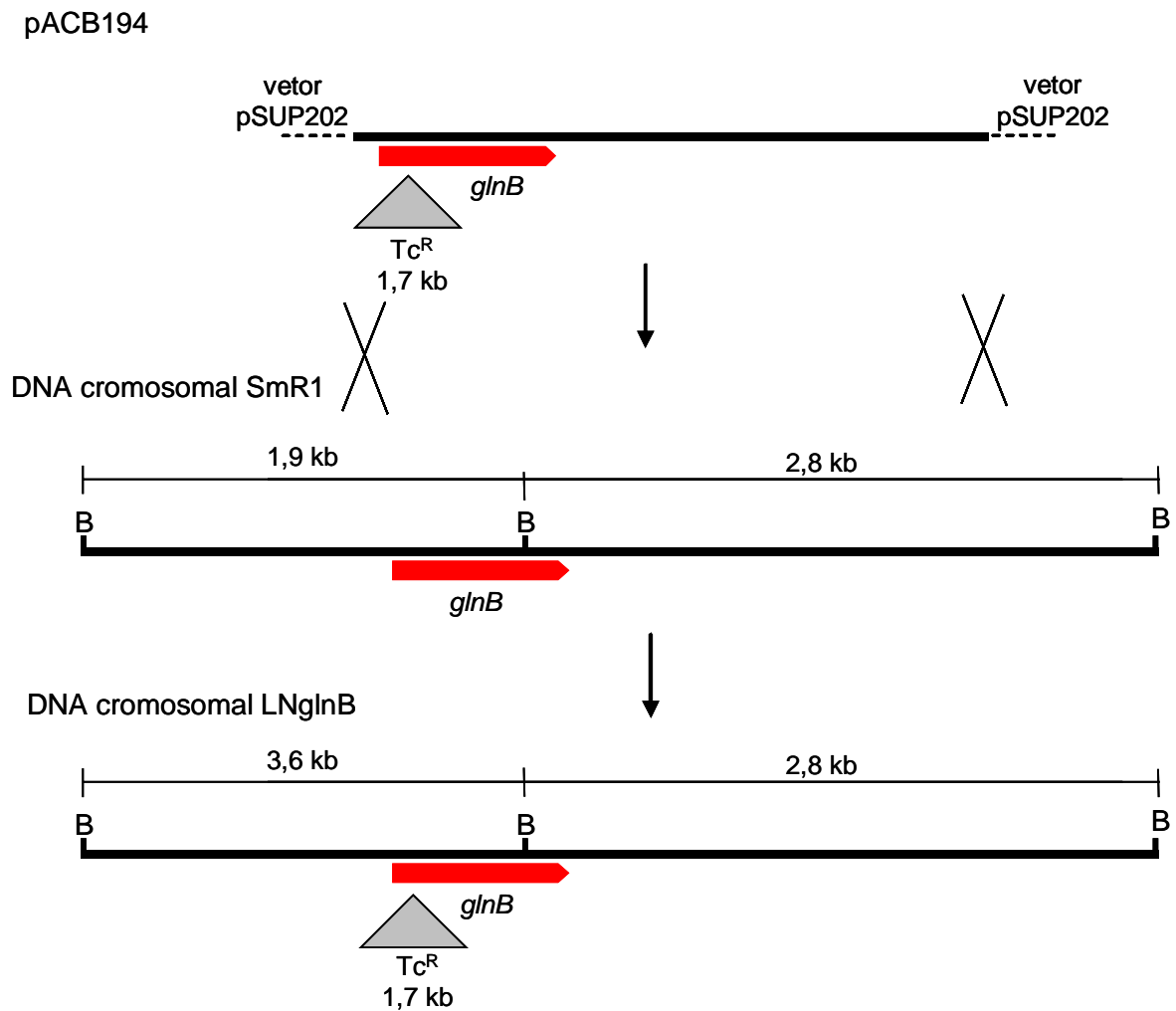
1 – Produto de amplificação obtido do DNA genômico da estirpe resultante de recombinação intramolecular onde ocorreu a reconstituição do gene *orf1*

2 – Produto de amplificação obtido do DNA genômico da estirpe LNorf1del

FIGURA 29 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DA ESTIRPE LNglNB DE *H. seropedicae*

As linhas 2 e 4 mostram a separação eletroforética em gel de agarose 0,8 %. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado sob luz UV. As linhas 3 e 5 mostram a autoradiografia da hibridização com a sonda pACB194. As imagens foram obtidas em Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). A linha 1 corresponde ao marcador de massa molecular; as linhas 2 e 3 correspondem à estirpe selvagem SmR1 e as linhas 4 e 5 correspondem à estirpe LNglNB. O DNA de ambas as estirpes foi digerido com a enzima de restrição *Bgl*III.

FIGURA 30 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA NA ESTIRPE LN $glnB$ DE *H. seropedicae*



Para a obtenção do mutante *glnB* de *H. seropedicae* o plasmídeo pACB194 (BONATTO, A. C., não publicado) que contém um transposon Tc^R inserido no gene *glnB*, foi introduzido na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* por conjugação. A integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla. B – sítio de restrição *Bgl*III.

4.4 FISILOGIA DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

4.4.1 Determinação da expressão da fusão *amtB::lacZ*-Km^R nas estirpes de SmR1, LNglnKdel e LNorfl1del *H. seropedicae*

Para determinar a expressão do gene *amtB*, a fusão cromossomal *amtB::lacZ*-Km^R foi introduzida nas estirpes SmR1, LNglnKdel e LNorfl1del, originando as estirpes LNamtBlacZ, LNglnKamtBlacZ e LNorflamtBlacZ, respectivamente (Material e Métodos 3.20). Para a realização dos ensaios de β -galactosidase as células foram cultivadas em meio NFbHP-malato contendo 2 mmol/L de NH₄Cl, 20 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato de sódio (Material e Métodos, item 3.27). Em todas as estirpes testadas a expressão do gene *amtB* foi dependente de amônio: a atividade máxima foi obtida quando as estirpes contendo a fusão *amtB::lacZ* foram crescidas na presença de 2 mmol/L de NH₄Cl ou de 5 mmol/L de glutamato de sódio (tabela 4). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no item 4.2. A estirpe LNglnKamtBlacZ apresentou atividade de β -galactosidase similar a da estirpe LNamtBlacZ. Já a estirpe LNorflamtBlacZ apresentou uma redução de aproximadamente 30% na atividade de β -galactosidase quando comparada à estirpe LNamtBlacZ (tabela 4). Estes resultados sugerem que a deleção em fase do gene *glnK* (mutante LNglnKdel) não causou efeito detectável na expressão do gene *amtB*. Já a deleção do gene *orf1* (mutante LNorfl1del) causou uma diminuição da expressão do gene *amtB* e provavelmente do gene *glnK*. Esta diminuição pode ser devida a uma mutação na região promotora do operon *orf1glnKamtB* ocorrida no evento de recombinação homóloga. Alternativamente a mutação de *orf1* poderia afetar a expressão dos genes *glnK* e *amtB* devido ao possível acoplamento da transcrição e tradução dos genes do operon *orf1glnKamtB*.

TABELA 4 – ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES L_{NamtBlacZ}, L_{NglnKamtBlacZ} E L_{Norf1amtBlacZ} DE *H. seropedicae*

Condições	Atividade de β -galactosidase [nmol <i>o</i> -nitrofenol/(min.mg proteína)]		
	Estirpes		
	L _{NamtBlacZ}	L _{NglnKamtBlacZ}	L _{Norf1amtBlacZ}
5 mmol/L glu	2472 \pm 201	2377 \pm 167	1681 \pm 233
2 mmol/L NH ₄ Cl	2119 \pm 110	2294 \pm 76	1489 \pm 107
20 mmol/L NH ₄ Cl	116 \pm 24	136 \pm 38	64 \pm 12

A atividade de β -galactosidase foi determinada como descrito por MILLER (1992) e expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min.mg proteína). As estirpes de *H. seropedicae* L_{NamtBlacZ}, L_{NglnKamtBlacZ} e L_{Norf1amtBlacZ} foram cultivadas em meio NFbHP-malato líquido suplementado com 2 mmol/L de NH₄Cl, 20 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato de sódio, a 30 °C. Os valores representam a média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes.

4.4.2 Análise da expressão do gene *amtH* de *H. seropedicae*

O padrão da expressão do gene *amtH* foi determinado na estirpe mutante L_{NamtH} cultivada na presença de 2 mmol/L de NH₄Cl, 20 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato (tabela 5). Esta estirpe contém um cassete *lacZ*-Km^R, com o gene *lacZ* na mesma orientação do promotor do gene *amtH*. A atividade de β-galactosidase desta estirpe foi muito baixa quando comparada a da estirpe L_{NamtBlacZ} (*amtB*::*lacZ*-Km^R), mas superior a da estirpe selvagem. Além disso, a expressão do gene *amtH* foi independente da fonte de nitrogênio utilizada. Uma vez que a expressão deste gene parece ser muito baixa e o possível início de tradução é um aminoácido não usual (valina), sugerindo baixa eficiência de tradução, é possível especular que o gene *amtH* de *H. seropedicae* possa ser um pseudogene.

4.4.3 Determinação da atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) nas estirpes de *H. seropedicae*

Uma das enzimas responsáveis pela assimilação do amônio em proteobactérias é a glutamina sintetase (GS), que condensa NH₄⁺ com L-glutamato produzindo L-glutamina:



Em condições limitantes de nitrogênio esta enzima encontra-se na sua forma ativa (não-adenililada). Já em condições de excesso de nitrogênio ela é inativada por adenililação.

O ensaio para determinação da atividade biossintética da GS mede a reação direta catalisada por esta enzima (BENDER et al., 1977).

TABELA 5 – ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DA FUSÃO CROMOSSOMAL *amtH::lacZ*-Km^R

Estirpes	Atividade de β -galactosidase [nmol <i>o</i> -nitrofenol/(min.mg proteína)]		
	Condições		
	5 mmol/L glu	2 mmol/L NH ₄ Cl	20 mmol/L NH ₄ Cl
SmR1	1 \pm 3	2 \pm 1	3 \pm 4
LNamtH	20 \pm 5	43 \pm 5	36 \pm 8

A atividade de β -galactosidase foi determinada como descrito por MILLER (1992) e está expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min.mg proteína). *H. seropedicae* estirpes SmR1 e LNamtH (*amtH::lacZ*-Km^R) foram cultivadas em meio NFbHP-malato suplementado com 2 mmol/L de NH₄Cl, 20 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato a 30 °C. Os valores representam a média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes.

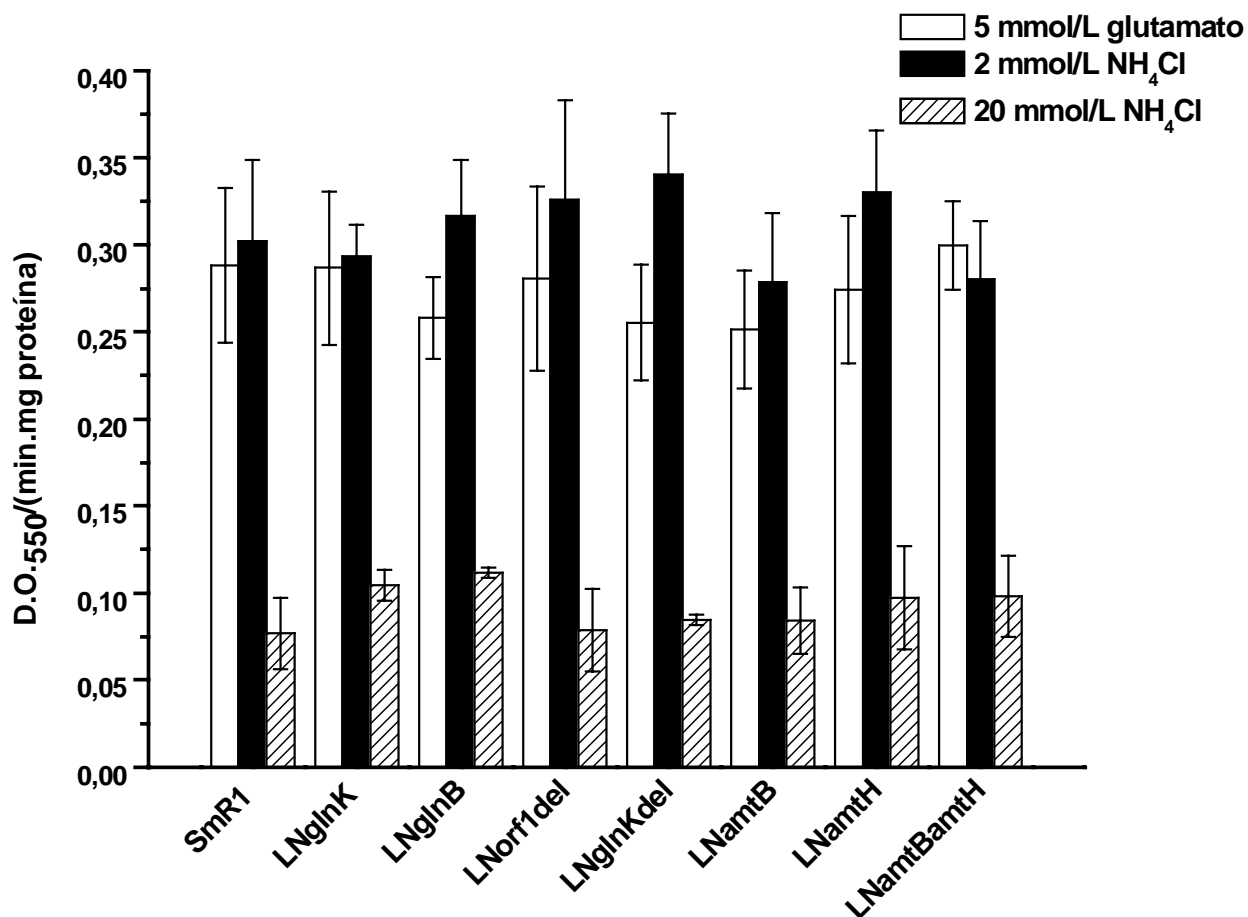
A atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) das estirpes SmR1, LNamtB, LNamtH, LNamtBamtH, LNglnK, LNglnKdel, LNglnB e LNorf1del de *H. seropedicae* foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.26). A atividade de GS em todas as estirpes testadas foi semelhante a da estirpe selvagem (figura 31), sugerindo que as proteínas AmtB, AmtH, GlnK, GlnB e Orf1 não estejam envolvidas na regulação da atividade de GS em *H. seropedicae*.

Proteínas do tipo PII estão envolvidas no controle da atividade da GS por adenililação em enterobactérias (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Como NtrC está envolvida na modulação da atividade da GS em *H. seropedicae* (PERSUHN et al., 2000), era esperado que a proteína GlnK, cuja expressão é regulada por NtrC, participasse deste processo. Porém a ausência de GlnK, não provoca alteração do controle da atividade da GS, indicando que outra (ou outras) proteína regulada por NtrC provavelmente esteja envolvida neste controle. Em *A. brasilense* as proteínas PII também não são necessárias para o controle da atividade da GS (de ZAMAROCZY et al., 1996; de ZAMAROCZY, 1998).

4.4.4 Determinação da atividade de transporte de amônio e metilamônio nas estirpes SmR1, LNamtB, LNamtH e LNamtBamtH de *H. seropedicae*

Devido à dificuldade experimental em medir o transporte de amônio em microrganismos, o análogo estrutural metilamônio vem sendo rotineiramente utilizado. O primeiro transportador de amônio investigado com a utilização de metilamônio radioativo ($[^{14}\text{C}]$ -metilamônio) foi o de *Penicillium chrysogenum* (HACKETTE et al., 1970). Desde então, o metilamônio radioativo passou a ser amplamente empregado no estudo de sistemas transportadores de amônio em fungos, bactérias e plantas (KLEINER, 1985). Amônio e metilamônio têm propriedades químicas similares. Ambos compostos são predominantemente protonados em pH neutro devido a seus elevados valores de pKa (9,25 para NH_4^+ , 10,7 para CH_3NH_3^+). Na forma não protonada (NH_3 e CH_3NH_2), ambos os compostos podem difundir-se facilmente através de membranas biológicas, embora estas membranas sejam impermeáveis a forma protonada (SIEWE et al., 1996).

FIGURA 31 – ATIVIDADE BIOSSINTÉTICA DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NAS DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae*

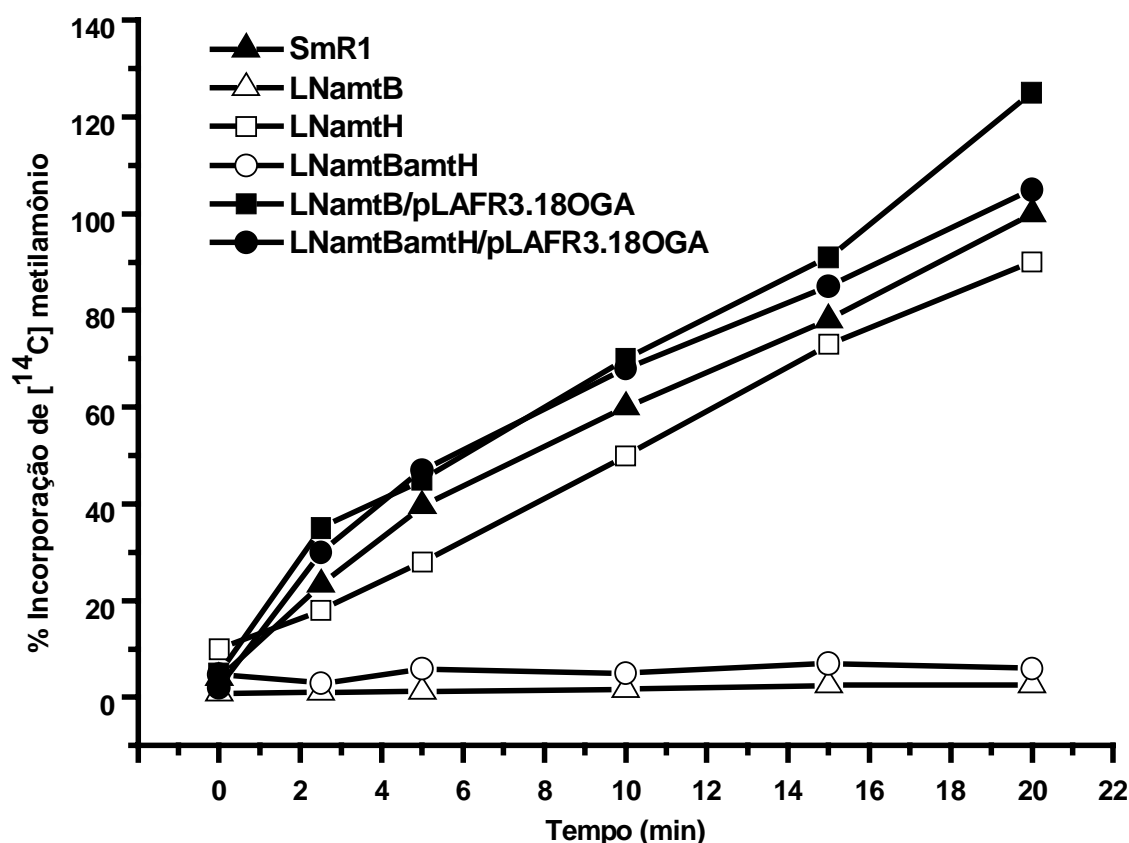


A atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.26). As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-malato suplementado com 2 mmol/L NH_4Cl , 20 mmol/L NH_4Cl ou 5 mmol/L de glutamato, sob agitação, a 30°C. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

Para determinar se a mutação nos genes *amtB* e *amtH* de *H. seropedicae* ou em ambos afeta a taxa de captação de metilamônio neste organismo, experimentos de transporte [^{14}C]-metilamônio foram realizados utilizando as estirpes SmR1 e mutantes LNamtB, LNamtH e LNamtBamtH (Material e Métodos, item 3.21) (figura 32).

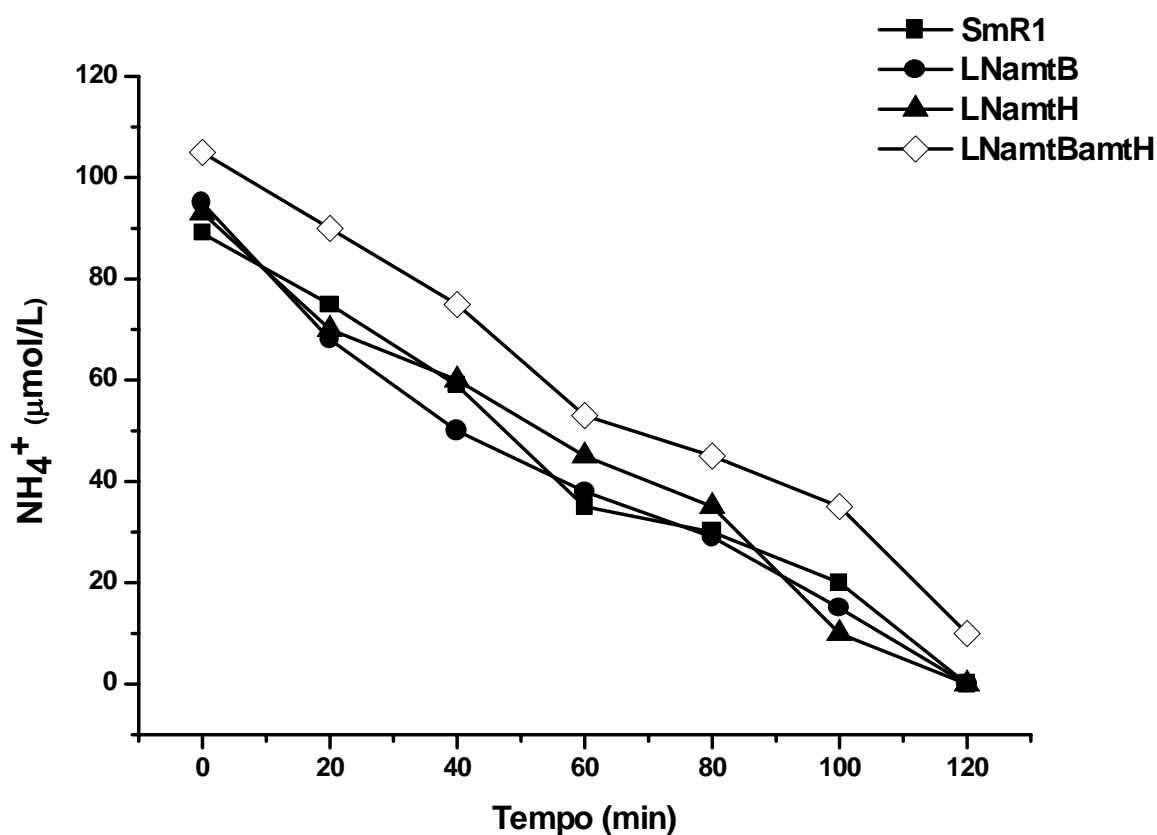
A estirpe LNamtH apresentou uma taxa de captação de metilamônio semelhante a da estirpe selvagem, sugerindo que o gene *amtH* não esteja envolvido na captação deste composto em *H. seropedicae*. Já as estirpes que possuem o gene *amtB* inativado (LNamtBTc e LNamtBamtH) são incapazes de transportar metilamônio, indicando que o produto deste gene é essencial para a captação de metilamônio, e provavelmente de amônio (figura 32). O fenótipo selvagem destas estirpes foi restaurado pelo plasmídeo pLAFR3.18OGA, que contém o operon *orf1glnKamtB* de *H. seropedicae* (figura 32). Mutantes *rpoN* e *ntrC* de *H. seropedicae* são incapazes de transportar metilamônio (REGO, F. G. M., não publicado), o que corrobora os resultados obtidos, uma vez que um promotor dependente de RpoN e da proteína NtrC foi identificado a montante do gene *orf1* de *H. seropedicae* (figura 15).

Ensaio de captação de amônio também foram realizados nas estirpes SmR1, LNamtB, LNamtH e LNamtBamtH de *H. seropedicae* (figura 33). Em todas as estirpes estudadas a captação de amônio foi semelhante. Em *E. coli* e *A. brasilense*, assim como em *H. seropedicae*, as estirpes mutantes *amtB* apresentam taxa de transporte de amônio semelhante às estirpes selvagens (THOMAS, MULLINS e MERRICK, 2000; SOUPENE et al., 1998; van DOMMELEN et al., 1998). Porém, a proteína AmtB de *E. coli* restaura o fenótipo selvagem de crescimento do triplo mutante *mep* de *S. cerevisiae*, mostrando que esta proteína é capaz de transportar amônio (JAVELLE et al., 2005). As constantes de afinidade de transportadores de $\text{NH}_4^+/\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ relatadas na literatura são da ordem de 10 $\mu\text{mol/L}$ (KLEINER, 1985), concentrações muito inferiores às utilizadas nos experimentos da figura 33. Estes resultados sugerem fortemente que os transportadores de amônio atuam principalmente em condições de limitação de amônio. Em concentrações da ordem de 100 $\mu\text{mol/L}$ a taxa de captação de amônio por difusão pela membrana na forma de NH_3 é suficientemente alta para prescindir de um sistema de transporte.

FIGURA 32 - TRANSPORTE DE METILAMÔNIO EM *H. seropedicae* ESTIRPES SmR1, LNamtB, LNamtH E LNamtHamtB

O experimento foi realizado com as estirpes SmR1, LNamtB, LNamtH, LNamtBamtH, LNamtB contendo o pLAFR3.18OGA (*orf1glnKamtB*) e LNamtBamtH contendo o pLAFR3.18OGA (*orf1glnKamtB*). As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em frascos de 25 mL contendo 5 mL de meio NFbLP-malato líquido suplementado com 2 mmol/L de NH_4Cl por 16-18 horas a 30 °C, sob agitação. Após este período, as culturas foram adicionadas de 10 $\mu\text{mol/L}$ ou 0,54 $\mu\text{Ci/mol}$ de $[^{14}\text{C}]$ -metilamônio. Aliquotas de 50 μL foram coletadas em diferentes tempos. A radioatividade incorporada nas células foi detectada no aparelho Phosphorimager Storm 820 (Molecular Dynamics). Os resultados são representados como porcentagem de $[^{14}\text{C}]$ -metilamônio incorporado pela estirpe selvagem em 20 minutos de incubação (100%).

FIGURA 33 – TRANSPORTE DE AMÔNIO NAS ESTIRPES SmR1, L_{NamtB}, L_{NamtH} E L_{NamtBamtH} DE *H. seropedicae*



O experimento foi realizado com as estirpes SmR1, L_{NamtB}, L_{NamtH} e L_{NamtBamtH}. As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio NFbLP-malato líquido suplementado com 20 mmol/L de NH₄Cl a 30° C e 120 rpm. As culturas foram diluídas 200 vezes em meio NFbLP-malato sem adição de nitrogênio (50 μL de células em 10 mL de meio) e incubadas a 30° C e 120 rpm por 4 horas. Após este período, 0,1 mmol/L de NH₄Cl foi adicionados às culturas. Aliquotas de 0,6 mL foram coletadas de tempos em tempos e imediatamente centrifugadas em tubos Eppendorf por 30 segundos a 13.000 x g. A concentração de NH₄⁺ presente no sobrenadante foi determinada pelo método do indofenol (CHANEY e MARBACH, 1962). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A análise estrutural das proteínas AmtB e AmtH de *H. seropedicae* sugerem que elas estejam envolvidas no transporte de amônio (item 4.1.2). Além disso, a proteína AmtB é necessária para a captação de metilamônio, o que também sugere seu envolvimento no transporte de amônio. Juntos esses resultados indicam que AmtB transporta amônio e metilamônio em *H. seropedicae*, enquanto que AmtH, se funcional, é específico para amônio.

Dois sistemas envolvidos no transporte de amônio foram identificados em *Rhodobacter capsulatus* (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002), *Rhodobacter sphaeroides* (CORDTS e GIBSON, 1987), *Corynebacterium glutamicum* (MEIER-WAGNER et al., 2001; JAKOBY et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (GAZZARRINI et al., 1999; SOHLENKAMP et al., 2000). Um sistema transporta amônio e metilamônio, enquanto outro transporta apenas amônio.

4.4.5 Ensaio de desligamento da nitrogenase nas estirpes SmR1 e LNamtB de *H. seropedicae*

Proteínas da família Amt estão envolvidas no desligamento da nitrogenase após a adição de íons amônio em *Azoarcus* sp. (MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002), *R. capsulatus* (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002) e *A. brasilense* (HUERGO et al., 2006). Como descrito no item 1.8 o controle pós-traducional nestes organismos ocorre através da ADP-ribosilação da proteína dinitrogenase redutase (FU et al., 1989; LUDDEN e ROBERTS, 1989; MASEPOHL, KREY e KLIPP, 1993; ZHANG et al., 1997). Porém, um mecanismo diferenciado de controle pós-traducional da nitrogenase, que não envolve ADP-ribosilação, ocorre em *H. seropedicae* (FU e BURRIS, 1989; KLASSEN et al., 1997). Genes similares a *draT* e *draG* não foram identificados neste organismo (FU e BURRIS, 1989; Projeto Genopar *H. seropedicae*). O mecanismo de controle da atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* permanece desconhecido.

Para verificar se a proteína AmtB de *H. seropedicae* está envolvida no controle pós-traducional da nitrogenase, as estirpes selvagem e mutante LNamtBTc foram testadas em experimentos de inibição reversível da nitrogenase utilizando 0,3 mmol/L ou 1 mmol/L de NH₄Cl (Material e Métodos, item 3.24) (figura 34).

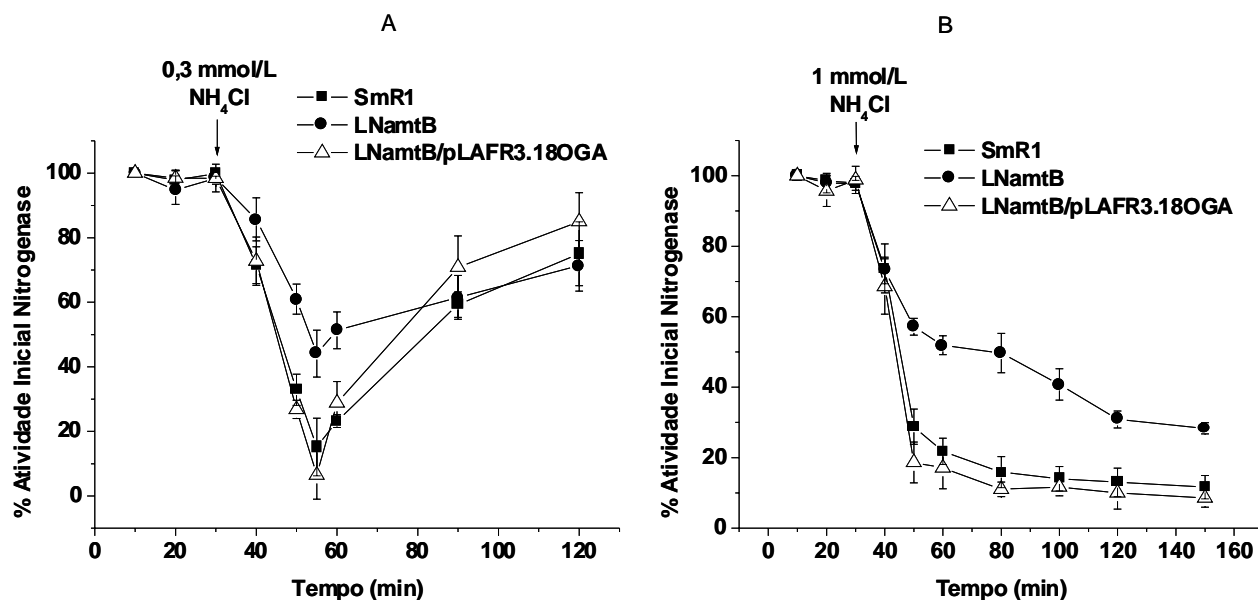
Quando 0,3 mmol/L de NH_4Cl foram adicionados a culturas fixando nitrogênio, a atividade de nitrogenase da estirpe selvagem e do mutante *amtB* foi rapidamente inibida. Porém, o desligamento da nitrogenase não foi completo na estirpe mutante L NamtB : enquanto a atividade da estirpe selvagem foi reduzida a valores próximos de zero, a estirpe mutante *amtB* reteve aproximadamente 40% da atividade inicial. Vinte e cinco minutos após a adição de amônio, ambas as estirpes começaram a recuperar a atividade de nitrogenase, alcançando 70-80% da atividade inicial após 90 minutos (figura 34 A).

A adição de 1 mmol/L de NH_4Cl também resultou em uma rápida inibição da atividade de nitrogenase na estirpe selvagem, mas não houve religamento da nitrogenase até 120 minutos após a adição de amônio (Figura 33 A). Isto ocorre porque neste período de tempo provavelmente não houve o consumo de todo o amônio adicionado. Na estirpe mutante *amtB* não ocorreu o desligamento completo da nitrogenase e a atividade também não foi recuperada. O plasmídeo pLAFR3.18OGA (contém o operon *orf1glnKamtB* de *H. seropedicae*) restaurou o fenótipo selvagem de inibição reversível por amônio da estirpe mutante *amtB* (figura 34 B).

Estes resultados indicam que a proteína AmtB é essencial para o desligamento completo da nitrogenase por adição de íons amônio em *H. seropedicae*. Este é o primeiro trabalho que mostra o envolvimento da proteína AmtB na sinalização do desligamento da nitrogenase em um organismo que não apresenta o sistema DraT/DraG (item 1.8.1).

A captação de amônio é semelhante nas estirpes selvagem e mutante *amtB* (figura 33) o que indica que a entrada deste íon na célula não é o sinal primário para o desligamento da nitrogenase. Além disso, a estirpe mutante L NamtB possui atividade de glutamina sintetase semelhante à da estirpe selvagem (figura 31), sugerindo que a metabolização de amônio também é normal nesta estirpe. Estes resultados sugerem que a deficiência no desligamento da nitrogenase pela adição de íons amônio na estirpe mutante *amtB* pode ser decorrente de deficiência na sinalização de aumento da concentração intracelular de amônio via proteína AmtB e possivelmente GlnK.

FIGURA 34 – INIBIÇÃO REVERSÍVEL DA NITROGENASE PELA ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO NAS ESTIRPES SmR1 E L_NamtB DE *H. seropedicae*



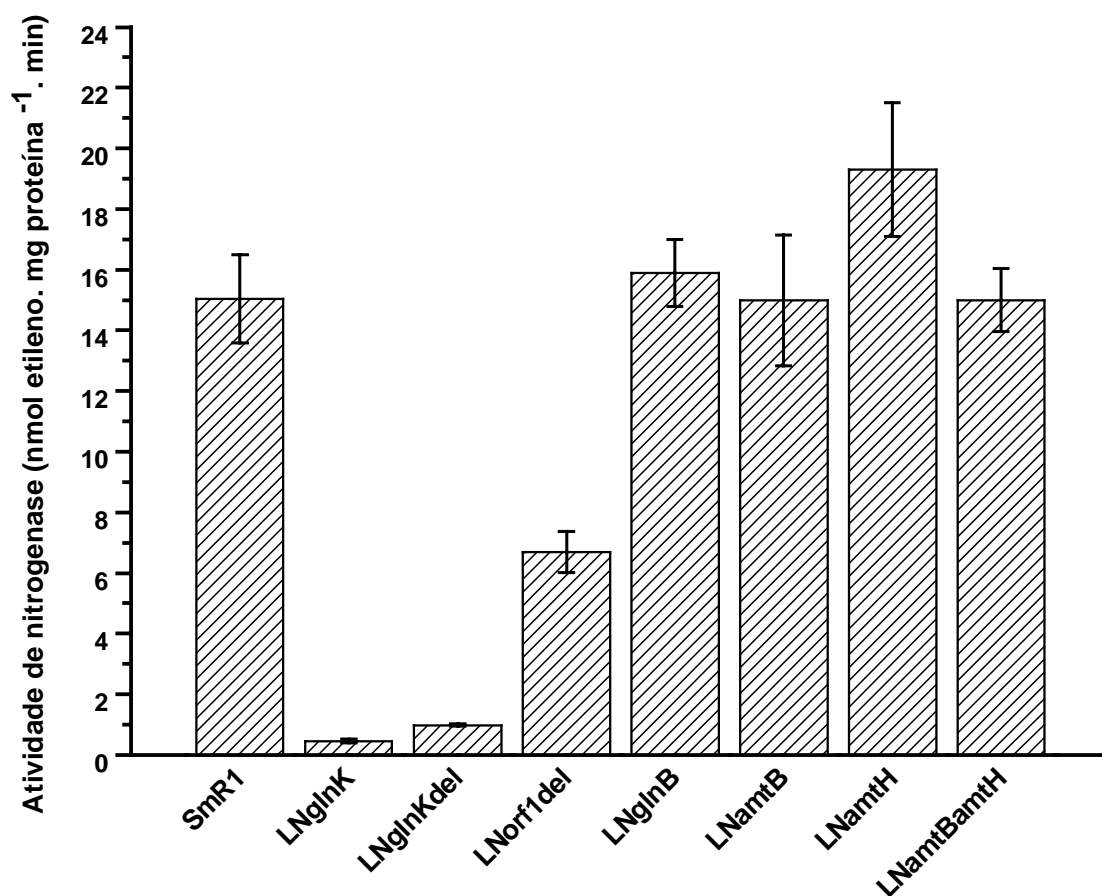
Os experimentos de inibição reversível da nitrogenase pela adição de íons amônio nas estirpes SmR1 (selvagem), L_NamtB (*amtB*::Tc^R) e L_NamtBpLAFR3.18OGA (*amtB*::Tc^R contendo o operon *orf1glnKamtB*) de *H. seropedicae* foram realizados como descrito em Material e Métodos (item 3.24). A atividade de nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno (KLASSEN et al., 1997). As células foram cultivadas por 16-18 horas em frascos de 60 mL contendo 10 mL de meio NFbHP-malato adicionado de 4 mmol/L de glutamato de sódio. NH_4Cl foi adicionado nos tempos indicados (setas). Painei A – adição de 0,3 mmol/L de NH_4Cl ; Painei B – adição de 1 mmol/L de NH_4Cl . Os resultados representam a média de no mínimo três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão.

4.4.6 Determinação da atividade de nitrogenase nas estirpes de *H. seropedicae*

A atividade de nitrogenase das estirpes SmR1, L_{NamtB}, L_{NglnK}, L_{NglnKdel}, L_{NglnB}, L_{NamtH}, L_{NamtBamtH} e L_{Norfl}del de *H. seropedicae* foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.23). As estirpes L_{NamtB}, L_{NamtH}, L_{NamtBamtH} e L_{NglnB} apresentam atividade de nitrogenase semelhante a da estirpe selvagem. Por outro lado, as estirpes L_{NglnK}, L_{NglnKdel} e L_{Norfl}del apresentam uma redução desta atividade (figura 35).

A atividade de nitrogenase das estirpes L_{NglnK} e L_{NglnKdel} representa aproximadamente 5% daquela observada para a estirpe selvagem (figura 35). O fenótipo Nif selvagem destas estirpes mutantes foi restaurado pelo plasmídeo pLAFR3.18OGA, que contém o operon *orf1glnKamtB*. Estes resultados sugerem que a proteína GlnK esteja envolvida na regulação da fixação de nitrogênio neste organismo.

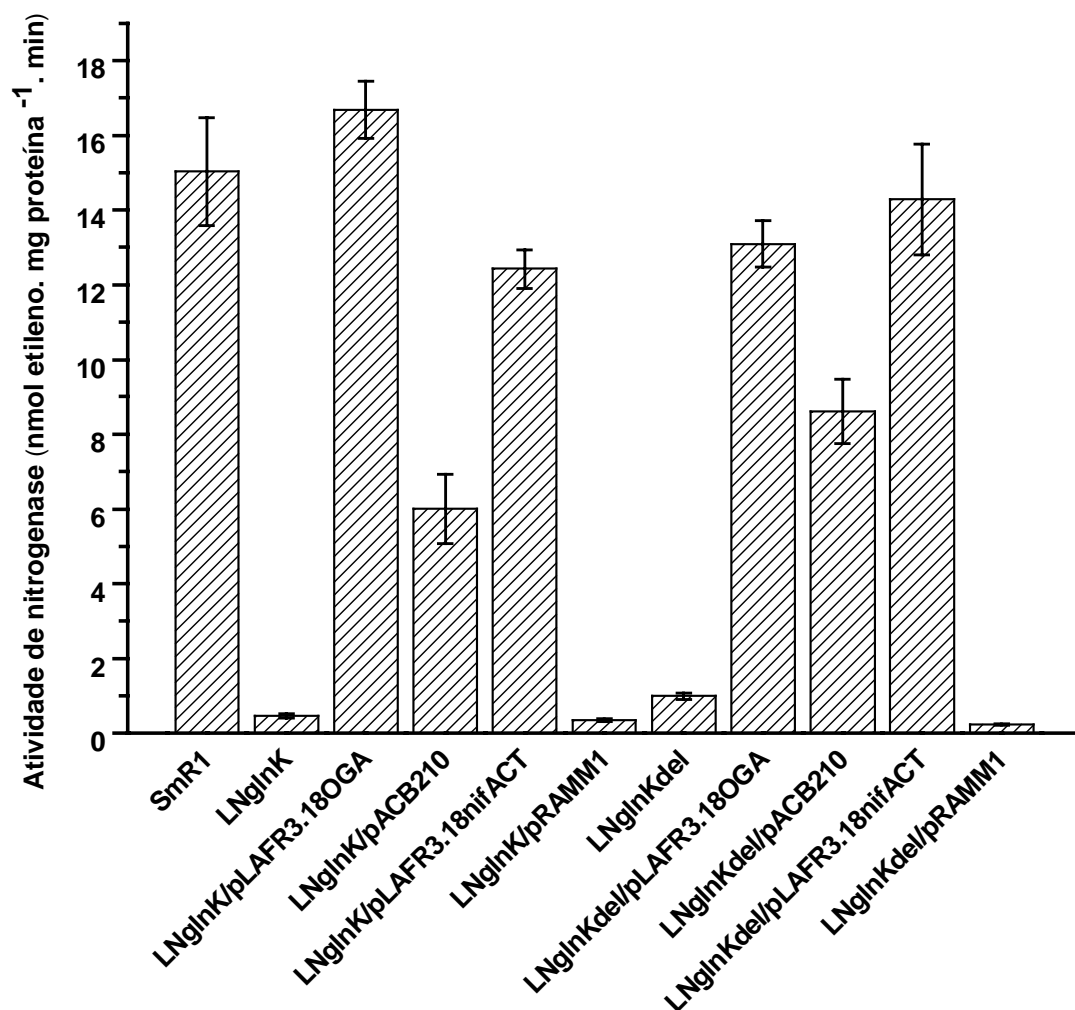
Em *H. seropedicae* a proteína NifA é o ativador transcricional dos genes *nif*. A transcrição do gene *nifA* é ativada pela proteína NtrC e regulada por amônio (SOUZA et al., 1999; SOUZA et al., 2000). A atividade da proteína NifA também é regulada de acordo com os níveis de amônio, sendo ativa somente em condições limitantes de nitrogênio fixado (SOUZA et al., 1999). Quando expressa em *E. coli* a proteína NifA foi incapaz de ativar a transcrição do gene *nifH* de *K. pneumoniae*. Por outro lado a proteína NifA N-truncada é ativa em *E. coli*, mas sua atividade não é regulada por amônio (MONTEIRO et al., 1999; SOUZA et al., 1999). Além disso, a proteína NifA de *H. seropedicae* pode ser ativa em *E. coli* quando co-expressa com a proteína GlnB de *A. brasilense* (MONTEIRO, 2001). Estes resultados sugerem que o domínio N-terminal possa estar envolvido na inibição dos demais domínios da proteína NifA em *H. seropedicae* e que proteínas do tipo PII sejam necessárias para ativação de NifA, provavelmente através do seu domínio N-terminal (MONTEIRO, 2001).

FIGURA 35 – ATIVIDADE DE NITROGENASE NAS DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae*

A atividade de nitrogenase das estirpes SmR1, LNglnK (*glnK::sacB-Km^R*), LNglnKdel (Δ *glnK*), LNorf1del (Δ *orf1*), LNglnB (*glnB::Tc^R*), LNamtB (*amtB::Tc^R*), LNamtH (*amtH::lacZ-Km^R*) e LNamtBamtH (*amtB::Tc^R/amtH::lacZ-Km^R*) foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.23). As células foram cultivadas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato. Após 36-48 horas de incubação a 30°C a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (KLASSEN et al., 1997). Os dados são baseados em no mínimo três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

O plasmídeo pLAFR3.18nifACT que contém a região promotora e a região codificadora dos domínios Central e C-terminal de NifA de *H. seropedicae* foi capaz de restaurar o fenótipo Nif selvagem das estirpes mutantes LN_{glnK} e LN_{glnKdel}. Por outro lado, o plasmídeo pRAMM1, que contém o gene *nifA* completo (MONTEIRO, R. A., não publicado), não complementa o fenótipo Nif (figura 36). Estes resultados sugerem que nos mutantes *glnK* a atividade da proteína NifA, e não sua expressão, está comprometida e que, portanto, GlnK está envolvida no controle da atividade de NifA. A proteína NifA N-truncada é ativa mesmo na ausência de GlnK, sugerindo que GlnK regule a atividade de NifA interagindo direta ou indiretamente com o domínio N-terminal.

O fenótipo Nif selvagem das estirpes mutantes *glnK* foi parcialmente restaurado pelo plasmídeo pACB210 que expressa a proteína GlnB de *H. seropedicae* a partir do seu próprio promotor (figura 36). Estes resultados sugerem que a proteína GlnB possa substituir, ao menos parcialmente, a proteína GlnK. A atividade de nitrogenase residual observada nos mutantes *glnK* pode ser devida a ativação da proteína NifA pela proteína GlnB. A ligação entre o domínio N-terminal da proteína NifA e as proteínas GlnK e GlnB de *H. seropedicae* foi demonstrada *in vitro* (BENELLI et al., 2002b). Os resultados obtidos estão de acordo com o modelo proposto por MONTEIRO (2001) que concluiu que em elevadas concentrações de amônio o domínio N-terminal da proteína NifA está interagindo com os demais domínios, impedindo que a proteína NifA torne-se ativa. Já em condições limitantes de nitrogênio, proteínas do tipo PII interagem com a proteína NifA através de seu domínio N-terminal, permitindo que esta proteína assuma uma conformação adequada para a sua atividade (MONTEIRO, 2001). Em *A. brasilense* e *Rhodospirillum rubrum* a proteína GlnB também é necessária para a atividade da proteína NifA (de ZAMAROCZY, PAQUELIN e ELMERICH, 1993; ZHANG et al., 2000).

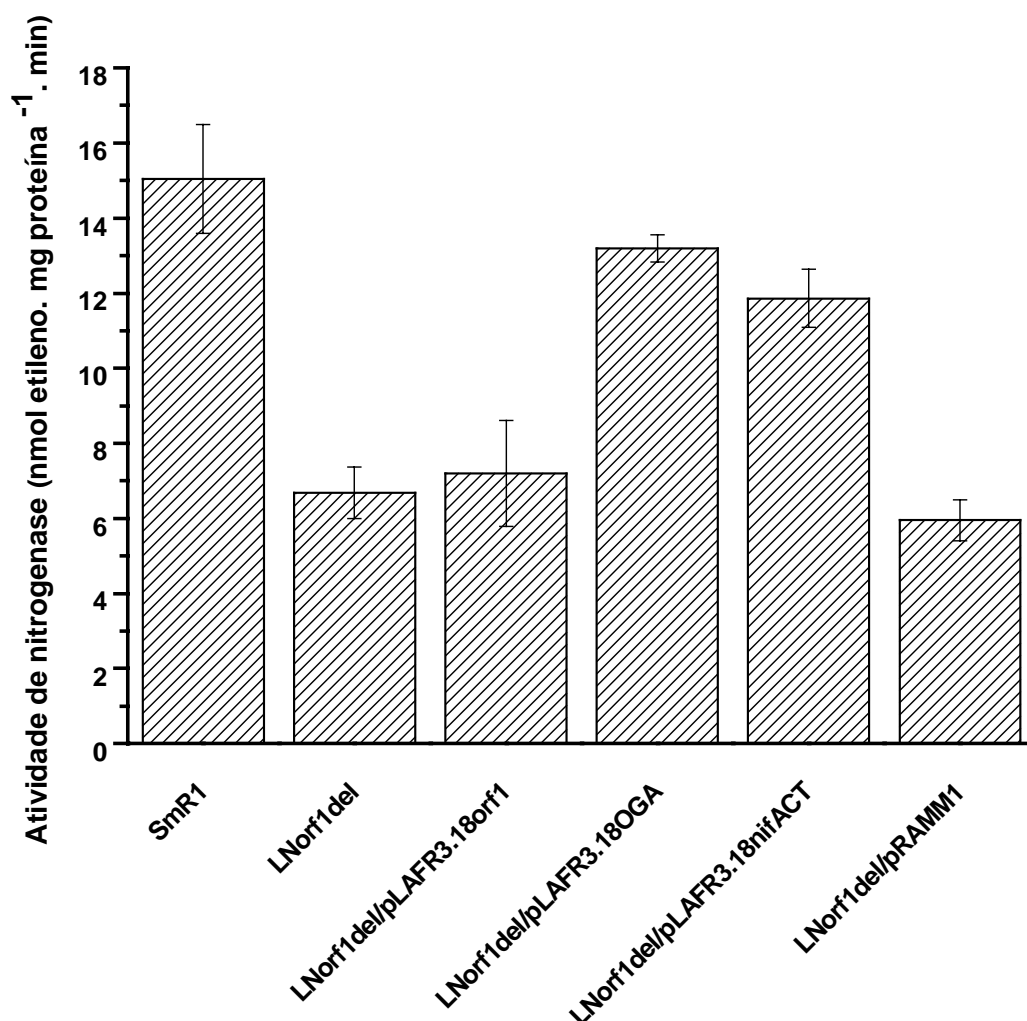
FIGURA 36 – ATIVIDADE DE NITROGENASE NAS ESTIRPES MUTANTES *glnK* DE *H. seropedicae* COMPLEMENTADAS COM DIFERENTES PLASMÍDEOS

A atividade de nitrogenase das estirpes mutantes LNglNk (*glnK::sacB-Km^R*), LNglNkdel (Δ *glnK*) e destas estirpes contendo os plasmídeos pLAFR3.18OGA (operon *orf1glnKamtB*), pACB210 (gene *glnB* com sua região promotora), pLAFR3.18nifACT (Δ N-*nifA* expresso a partir de seu próprio promotor) e pRAMM1 (gene *nifA* e sua região promotora) foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.23). As células foram cultivadas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com glutamato 0,5 mmol/L. Após 36-48 horas de incubação a 30°C a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (KLASSEN et al., 1997). Os dados são baseados em no mínimo três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

Em células cultivadas em concentrações limitantes de nitrogênio a proteína GlnK é expressa em elevadas quantidades e provavelmente está interagindo com a proteína NifA, que se encontra na sua forma ativa (MONTEIRO, 2001). A adição de amônio a esta cultura levaria à inativação da proteína NifA, provavelmente devido ao impedimento da ligação desta proteína com GlnK e GlnB. Este impedimento poderia ocorrer via desuridililação das proteínas PII (PII não-modificada seria incapaz de ligar NifA) ou devido ao seqüestro destas proteínas para a membrana celular via AmtB, como observado em *E. coli*, *A. vinelandii* e *C. glutamicum* e *B. subtilis* (COUTTS et al., 2002; DETSCH e STULKE, 2003; STROSSER et al., 2004). Outra alternativa é que a proteína NifA estaria sempre ligada a GlnK e que o estado de uridililação desta última provocaria uma mudança conformacional em NifA. Quando ligada a GlnK-UMP, NifA estaria ativa e quando ligada a GlnK não modificada, NifA estaria inativa.

A estirpe LNorfl~~del~~ apresentou atividade de nitrogenase de aproximadamente 50% daquela obtida para a estirpe selvagem (figura 35). Assim como as estirpes mutantes *glnK*, o fenótipo selvagem deste mutante foi restaurado pelos plasmídeos pLAFR3.18OGA (contém o operon *orf1glnKamtB*) e pLAFR3.18nifACT (contém a região promotora e a região codificadora dos domínios Central e C-terminal de NifA). Este mutante não foi complementado, porém, com os plasmídeos pRAMM1 (contém o gene *nifA*) e pLAFR3.18ORF1 (contém o gene *orf1* de *H. seropedicae* e sua região promotora) (figura 37). Estes resultados sugerem que o fenótipo observado no mutante LNorfl~~del~~ seja um efeito da queda na expressão de *glnK* e não um efeito da mutação de *orf1*. A queda na expressão de *glnK* pode ser deduzida dos experimentos de atividade de β -galactosidase da fusão cromossomal da estirpe LNorflamtBlacZ (item 4.4.1). Estes experimentos mostraram que ocorre uma redução de aproximadamente 30-35% na atividade de β -galactosidase do mutante *orf1* quando comparada à estirpe selvagem, compatível com a redução de aproximadamente 50% na atividade de nitrogenase.

FIGURA 37 – ATIVIDADE DE NITROGENASE NA ESTIRPE MUTANTE LNorf1del DE *H. seropedicae* COMPLEMENTADA COM DIFERENTES PLASMÍDEOS



A atividade de nitrogenase da estirpe mutante LNorf1del e desta estirpe contendo os plasmídeos pLAFR3.18orf1 (gene *orf1*) pLAFR3.18OGA (*orf1glnKamtB*), pLAFR3.18nifACT (ΔN -*nifA* expresso a partir de seu próprio promotor) e pRAMM1 (gene *nifA* e sua região promotora) foi determinada como descrito em Material e Métodos (item 3.23). As células foram crescidas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com glutamato 0,5 mmol/L. Após 36-48 horas de incubação a 30 °C a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (KLASSEN et al., 1997). Os dados são baseados em no mínimo três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

4.4.7 Expressão dos genes *nifA* e *nifB* nas estirpes SmR1 e LNglnK de *H. seropedicae*

Para determinar a expressão dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae* foram utilizados os plasmídeos pRW1 (WASSEM et al., 2002), que contém uma fusão transcricional *nifA::lacZ*, e o plasmídeo pEMS140 (REGO, 1997), que contém uma fusão transcricional *nifB::lacZ*. A atividade de β -galactosidase foi determinada em células desreprimidas para nitrogenase em meio isento de nitrogênio por 7 horas e na presença de 1,5% de oxigênio (Material e Métodos, item 3.27).

A atividade de β -galactosidase da fusão *nifA::lacZ* no mutante LNglnK foi similar à da estirpe selvagem, indicando que a mutação de *glnK* não afeta de forma substancial a expressão da proteína NifA em *H. seropedicae* (tabela 6). Por outro lado, a atividade de β -galactosidase da fusão *nifB::lacZ* foi reduzida na estirpe mutante LNglnK a cerca de 10% da atividade da estirpe selvagem (tabela 6). Uma vez que a expressão do gene *nifB* é dependente da proteína NifA, e que a expressão do gene *nifA* não está significativamente alterada na estirpe mutante *glnK*, os resultados sugerem, que a redução na expressão de *nifB* seja decorrente da inibição da atividade de NifA. Assim, parece que a proteína GlnK está envolvida no controle pós-traducional da proteína NifA em *H. seropedicae*. Estes resultados corroboram aqueles obtidos através dos experimentos de determinação de nitrogenase das estirpes mutantes *glnK* (item 4.4.6), que sugeriram que a proteína GlnK está envolvida na ativação de NifA, provavelmente através da interação com o domínio N-terminal desta proteína.

A atividade de β -galactosidase residual da fusão *nifB::lacZ* no mutante LNglnK pode ser devido a ativação da proteína NifA pela proteína GlnB. Esta possível ativação foi sugerida também pelos experimentos de nitrogenase, onde se mostrou que os mutantes *glnK* apresentam atividade residual de nitrogenase e que a proteína GlnB é capaz de restaurar parcialmente o fenótipo selvagem destes mutantes (item 4.4.6).

TABELA 6 – ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DAS FUSÕES *nifA::lacZ* E *nifB::lacZ* NAS ESTIRPES SmR1 E LNglNk

Estirpes	Atividade de β -galactosidase [nmol <i>o</i> -nitrofenol/(min.mg proteína)]			
	Plasmídeos			
	nenhum	pRW1 (<i>nifA::lacZ</i>)	pEMS140 (<i>nifB::lacZ</i>)	pPW452
SmR1	25 \pm 9	700 \pm 125	2776 \pm 112	57 \pm 15
LNglNk	18 \pm 7	649 \pm 114	247 \pm 26	44 \pm 22

A atividade de β -galactosidase das estirpes SmR1 (selvagem) e LNglNk (*glnK::sacB-Km^R*) e destas estirpes contendo os plasmídeos pRW1 (*nifA::lacZ*), pEMS140 (*nifB::lacZ*) e pPW452 (vetor) foi determinada como descrito por MILLER (1992) e está expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min.mg proteína). *H. seropedicae* SmR1 e LNglNk foram cultivadas em meio NFbHP-malato suplementado com 10 mmol/L de NH₄Cl a 30 °C. As células foram centrifugadas, ressuspensas em meio NFbHP-malato livre de nitrogênio e desreprimidas por 7 horas sob atmosfera contendo 1,5% de oxigênio. Os valores representam a média de no mínimo três experimentos independentes \pm desvio padrão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o operon *orf1glnKamtB* está envolvido na regulação do metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae*. A proteína AmtB é necessária para a captação de metilamônio, e provavelmente, também está envolvida na captação de amônio nesta bactéria. Além disso, esta proteína faz parte do mecanismo de regulação pós-traducional da nitrogenase, sendo necessária para o desligamento total da nitrogenase pela adição de íons amônio. A proteína AmtB parece participar do sistema de sensoriamento de amônio pela célula. Este é o primeiro trabalho que descreve o envolvimento da proteína AmtB no controle pós-traducional da nitrogenase em organismos que não apresentam o sistema DraT/DraG.

Os resultados apresentados indicam também que a proteína GlnK é necessária para a atividade da proteína NifA, ativador transcricional de genes *nif*. A função da proteína Orf1 não foi determinada, sendo necessários experimentos adicionais para sua caracterização. Porém, a expressão coordenada dos genes *orf1*, *glnK* e *amtB* em diversas bactérias sugere que seus produtos interagem fisicamente. A provável localização da Orf1 no espaço periplasmático sugere uma interação desta proteína com AmtB, localizada na membrana plasmática. É possível que Orf1 esteja envolvida na captação de amônio em *H. seropedicae* ou ainda que participe do sistema celular de sensoriamento de amônio.

A proteína GlnB de *H. seropedicae*, assim como GlnK, é capaz de ativar a proteína NifA. Porém, um mutante *glnB* de *H. seropedicae* apresenta fenótipo Nif⁺, sugerindo que em condições fisiológicas a atividade da proteína NifA é controlada por GlnK, e não requer GlnB.

A função da proteína AmtH, provável transportador de amônio, também não foi determinada, uma vez que nenhum fenótipo diferente da estirpe selvagem foi identificado na estirpe mutante *amtH*.

6 CONCLUSÕES

- O gene *orf1* é co-transcrito com os genes *glnK* e *amtB* em *H. seropedicae*;
- A proteína Orf1 localiza-se provavelmente na membrana externa da célula ou no espaço periplasmático e não apresenta homologia com nenhuma proteína de função conhecida;
- O operon *orf1glnKamtB* é conservado em β -proteobactérias, sugerindo uma interação direta entre seus produtos;
- *H. seropedicae* possui dois genes que codificam para prováveis proteínas transportadoras de amônio: *amtB* e *amtH*;
- A proteína AmtH localiza-se provavelmente na membrana interna da célula e apresenta 10 prováveis regiões transmembrana.
- A proteína AmtB é necessária para o controle pós-traducional da nitrogenase em *H. seropedicae*;
- A proteína AmtB é essencial para o transporte de metilamônio em *H. seropedicae*;
- A proteína GlnK está envolvida no controle da atividade de NifA em *H. seropedicae*;
- A proteína GlnB é capaz de substituir parcialmente a proteína GlnK na ativação de NifA em *H. seropedicae*;

- As proteínas Orf1, GlnK, AmtB, GlnB e AmtH não estão envolvidas no controle da atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) em *H. seropedicae*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6264-6272, 1975.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, S. L.; DICKMANN, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 14994-14999, 2005.

APWEILER, R.; ATTWOOD, T. K.; BAIROCH, A.; BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; BISWAS, M.; BUCHER, P.; CERUTTI, L.; CORPET, F.; CRONING, M. D. R.; DURBIN, R.; FALQUET, L.; FLEISCHMANN, W.; GOUZY, J.; HERMIAKOB, H.; HULO, N.; JONASSEN, I.; KAHN, D.; KANAPIN, A.; KARAVIDOPOULOU, Y.; LOPEZ, R.; MARX, B.; MULDER, N. J.; OINN, T. M.; PAGNI, M.; SERVANT, F.; SIGRIST, C. J. A.; ZDOBNOV, E. M. InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 37-40, 2001.

ARAÚJO, M. S.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *In vitro* uridylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Prot. Express. Purif.**, v. 33, p. 19-24, 2004.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 263-270, 1999.

ARCONDÉGUY, T.; LAWSON, D.; MERRICK, M. Two residues in the T-loop of GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 38452-6, 2000.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

ATKINSON, R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 431-447, 1998.

ATKINSON, R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 301-313, 1999.

BAKOUH, N.; BENJELLOUN, F.; HULIN, .; BROUILLARD, F.; EDELMAN, A.; CHERIF-ZAHAR, B.; PLANELLES, G. NH₃ is involved in the NH₄⁺ transport induced by the functional expression of the human Rh C glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 15975-15983, 2004 .

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bact.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BENDER, R. A.; JANSSEN, K. A.; RESNICK, A. D.; BLUMENBERG, M.; FOOR, F.; MAGASANIK, B. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 129, p. 1001-1009, 1977.

BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; von HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, v. 340, p. 783-795, 2004.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p. 309-314, 2001.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 3296-3302, 2002a.

BENELLI, E. M.; MONTEIRO, R. A.; NOINDORF, L.; SOUZA, E. M. S.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. PII and GlnK proteins interact *in vitro* with the N-terminal domain of the NifA protein from *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXXI Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxambu. **Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual**. p. 236, 2002b.

BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 203-214, 2002.

BLOOM, F. R.; LEVIN, M. S.; FOOR, F.; TYLER, B. Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. **J. Bacteriol.**, v. 134, p. 569-577, 1978.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; BENELLI, E. M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signalling. **Res. Microbiol.**, v. 156, p. 634-640, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII - regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 68, p. 2949-2953, 1971.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of the *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 164, p. 816-822, 1985.
- BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9339-9342, 1991.
- BURRIS, R. H.; HARTMANN, A.; ZHANG, Y.; FU, H. Control of nitrogenase in *Azospirillum* sp. **Plant Soil**, v. 137, p. 127-134, 1991.
- CARR, P. D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 52, p. 93-104, 1996.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin. Chem.**, v. 8, p. 130-132, 1962.
- CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, v. 2, p. 981-990, 1994.
- CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr → Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Genet. Genomics**, v. 273, p. 415-422, 2005.
- CORDTS, M. L.; GIBSON, J. Ammonium and methylammonium transport in *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 1632-1638, 1987.
- COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536-545, 2002.
- de ZAMAROCZY, PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Function organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2507-2515, 1993.
- de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4143-4149, 1996.
- de ZAMAROCZY, M. Structural homologues P_{II} and P_Z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 449-463, 1998.
- DETSCH, C.; STULKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology**, v. 149, p. 3289-3297, 2003.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 6127-6145, 1988.

- DREPPER, T.; GROSS, S.; YAKUNIN, A. F.; HALLENBECK, P. C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203-2212, 2003.
- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v. 301, p. 302-307, 1983.
- DURNER, J.; BOHM, I.; HILZ, H.; BOGER, P. Posttranslational modification of nitrogenase. Differences between the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* and the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Eur. J. Biochem.**, v. 220, p. 125-130, 1994.
- ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of glutamine synthetase. II. Metabolic regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 191, p. 602-612, 1978.
- FRANCIS, S. H.; ENGLEMAN, E. G. Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. I. Studies on the uridylyl transferase and uridylyl removing enzyme(s) from *E. coli*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 19, p. 590-601, 1978.
- FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4679-4685, 1989.
- FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3168-3175, 1989.
- GARCIA, E.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 2246-2253, 1983.
- GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FORMMER, W. B.; von WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, v. 11, p. 937-948, 1999.
- GOVANTES, F.; MOLINA-LOPEZ, J. A.; SANTERO, E. Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 6817-6823, 1996.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum-tolerant rice varieties. **New phytol.**, v. 154, p. 131-146, 2002.
- HAAKER, H.; LAANE, C.; HELLINGWERF, K.; HOUWER, B.; KONINGS, W. N.; VEEGER, C. Short-term regulation of the nitrogenase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. **Eur. J. Biochem.**, v. 127, p. 639-645, 1982.
- HACKETTE, S. L.; SKYE, G. E.; BURTON, C.; SEGEL, I. H. Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-¹⁴C as the substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 245, p. 4241-4250, 1970.
- HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.
- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 165, p. 864-870, 1986.

- HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.
- HENDERSON, N.; AUSTIN, S. A.; DIXON, R. A. Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 216, p. 484-491, 1989.
- HOWARD, J. B. REES, D. C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 235-264, 1994.
- HOWARD, B. J.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.
- HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; ARAUJO, M. S.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Mol. Microbiol.**, v. 59, p. 326-337, 2006.
- HYNES, M.F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M.P.; PUHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v. 78, p. 111-120, 1989.
- JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of nif expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.
- JAKOBY, M.; NOLDEN, L.; MEIER-WAGNER, J.; KRAMER, R. & BURKOVSKI, A. AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 964-977, 2000.
- JAMES, E. K.; OLIVARES F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 77-119, 1998.
- JAVELLE, A.; EMMANUELE, S.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 8530-8538, 2004.
- JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 170-172, 2005.
- JAVELLE, A.; THOMAS, G.; MARINI, A. M.; KRAMER, R.; MERRICK, M. *In vivo* functional characterisation of the *E. coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. **Biochem. J.**, v. 390, p. 215-222, 2005.
- JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyl-transferase/uridylyl-removing enzyme (E.C.2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p. 12782-12794, 1998a.
- JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. **Biochemistry**, v. 37, p. 12802-12810, 1998b.
- JIANG, P.; NINFA, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1906-1911, 1999.

JONES, B. L.; MONTY, K. J. Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodopseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. **J. Bacteriol.**, v. 139, p. 1007-1013, 1979.

JOUANNEAU, Y.; ROBY, C.; MEYER, C. M.; VIGNAIS, P. M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase em *Rhodobacter capsulatus*. **Biochemistry**, v. 28, p. 6524-6530, 1989.

KAHSAY, R. B.; GAO, G. R.; LIAO, L. Discriminating Transmembrane Proteins From Signal Peptides Using SVM-Fisher Approach. In: **Proceedings of the fourth international conference on machine learning and applications**. p. 151-155, 2005.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Effect of Mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, Encoding Nitrogen Regulator II (NRII or NtrB), on the Phosphatase Activity Involved in Bacterial Nitrogen Regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28294-28299, 1994.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J. 3RD; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L. J.; STROUD, R. M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, v. 305, p. 1587-1594, 2004.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p.389-397, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 165-170, 1999.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; INABA, J.; PEDROSA, F. O. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6710-6713, 2001.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; COSTA, R. M.; INABA, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 5637-5641, 2005.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 87-100, 1985.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. J. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 1779-1784, 1988.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHIMITZ, R. A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 223-234, 2002.

KLUGKIST, J.; HAAKER, H. Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 157, p. 148-151, 1984.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology : A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KOKOTTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene**, v. 84, p. 467-471, 1989.

KUSTU, S.; HIRSCHMAN, J.; BURTON, D.; JELESKO, J.; MEEKS, J.C. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. **Mol. Gen. Genet.**, v. 197, p. 309-317, 1984.

LAANE, C.; KRONE, W.; KONINGS, W.; HAAKER, H.; VEEGER, C. Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 103, p. 39-46, 1980.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; VAN HEESWIJK, W.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J.**, v. 19, p. 6041-6059, 2000.

LOWERY, R. G.; SAARI, L. L.; LUDDEN, P. W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. **J. Bacteriol.**, v. 166, p. 513-518, 1986.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p.16714-16719, 1988.

LUDDEN, P. W.; BURRIS, R. H. Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. **Science**, v. 194, p. 424-426, 1976.

LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. **Curr. Top. Cell. Regul.**, v. 30, p. 23-56, 1989.

LUDEWIG, U. Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein. **J. Physiol.**, v. 559, p. 751-759, 2004.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Res.**, v. 29, p. 1599-1602, 1996.

MARINI, A. M.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRE, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 13, p. 3456-3463, 1994.

MARINI, A. M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRE, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 4282-4293, 1997.

MARINI A. M.; MATASSI G.; RAYNAL V.; ANDRE B.; CARTRON J. P.; CHERIF-ZAHAR B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. **Nat. Genet.**, v. 26, p. 341-344, 2000.

MARINI A. M.; BOECKSTAENS M.; BENJELLOUN F.; CHERIF-ZAHAR B.; ANDRE B. Structural involvement in substrate recognition of an essential aspartate residue conserved in Mep/Amt and Rh-type ammonium transporters. **Curr. Genet.**, v. 49, p. 364-374, 2006.

MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and postranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 2251-2259, 2002.

MASEPOHL, B.; KREY, R.; KLIPP, W. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2667-2675, 1993.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PUHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 212, p. 27-37, 1998.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single-strand DNA “blue” T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Eng.**, v. 1, p. 67-74, 1986.

MEIER-WAGNER, J.; NOLDEN, L.; JAKOBY, M.; SIEWE, R.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: a role of Amt and AmtB. **Microbiology**, v. 147, p. 135-143, 2001.

MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-Amt* operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3260-3264, 1998.

MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 835-876, 1992.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (eds). **New horizons in nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-12, 1993.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A.. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MILLER J. H. **Experiments in Molecular Genetics**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Isolation and properties of the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4461-4468, 1999.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999.

MONTEIRO, R. A. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2001. 194 p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria, **Proteins**, v. 11, p. 95-110, 1991.

NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 5909-5913, 1986.

NINFA, A. J.; BENNETT, R. L. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6888-6893, 1991.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7024-7032, 1993.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 168-173, 2005.

NINNEMANN, O. ; JAUNIAUX, J.; FROMMER, W. B. Identification of high affinity NH_4^+ transporter from plants. **EMBO J.**, v. 13, p. 3464-3471, 1994.

NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 843-846, 1997.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217-221, 2000.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

POPE, M. R.; MURRELL, S. A.; LUDDEN, P. W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosina diphosphoribosilation of a specific arginine residue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3173-3177, 1985.

REGO, F. G. M.. **Sequenciamento do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização da sua região promotora**. Curitiba, 1997. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RIPOCHE, P.; BERTRAND, O.; GANE, P.; BIRKENMEIER, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J. P. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH₃ into red blood cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 17222-17227, 2004.

ROBERTS, G. P.; MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 136, p. 267 – 279, 1978.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v.35, p.261-270, 2003.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 812-820, 2002.

SAARI, L. L.; POPE, M. R.; TRIPLETT, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 15502-15508, 1984.

SAARI, L. L.; POPE, M. R.; MURRELL, S. A.; LUDDEN, P. W. Studies on the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 4973-4977, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHINDELIN, H.; KISKER, D.; SCHELESSMAN, J. L.; HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v. 387, p. 370-376, 1997.

SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol.**, v. 123, p. 407-410, 1975.

SIEWE, R. M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANN, B. J.; EIKMANN, M.; KRÄMER, R. Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5398-5403, 1996.

SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1096, 1984.

SOHLENKAMP, C.; WOOD, C. C.; ROEB, G. W.; UDVARDI, M. K. Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiol.**, v. 130, p. 1788-1796, 2002.

SON, H.S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: Purification and properties of P-II protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p. 7030-7034, 1998.

SOUZA, E. M. **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1990. 264 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, E. .M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 425 – 429, 1991a.

SOUZA, E. .M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1511-1522, 1991b.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERGER, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molec. Biol.**, v. 9, p. 27-39, 1987.

STIPS, J.; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R. A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3379-3388, 2004.

STROSSER, J.; LUDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRAMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 123-147, 2004.

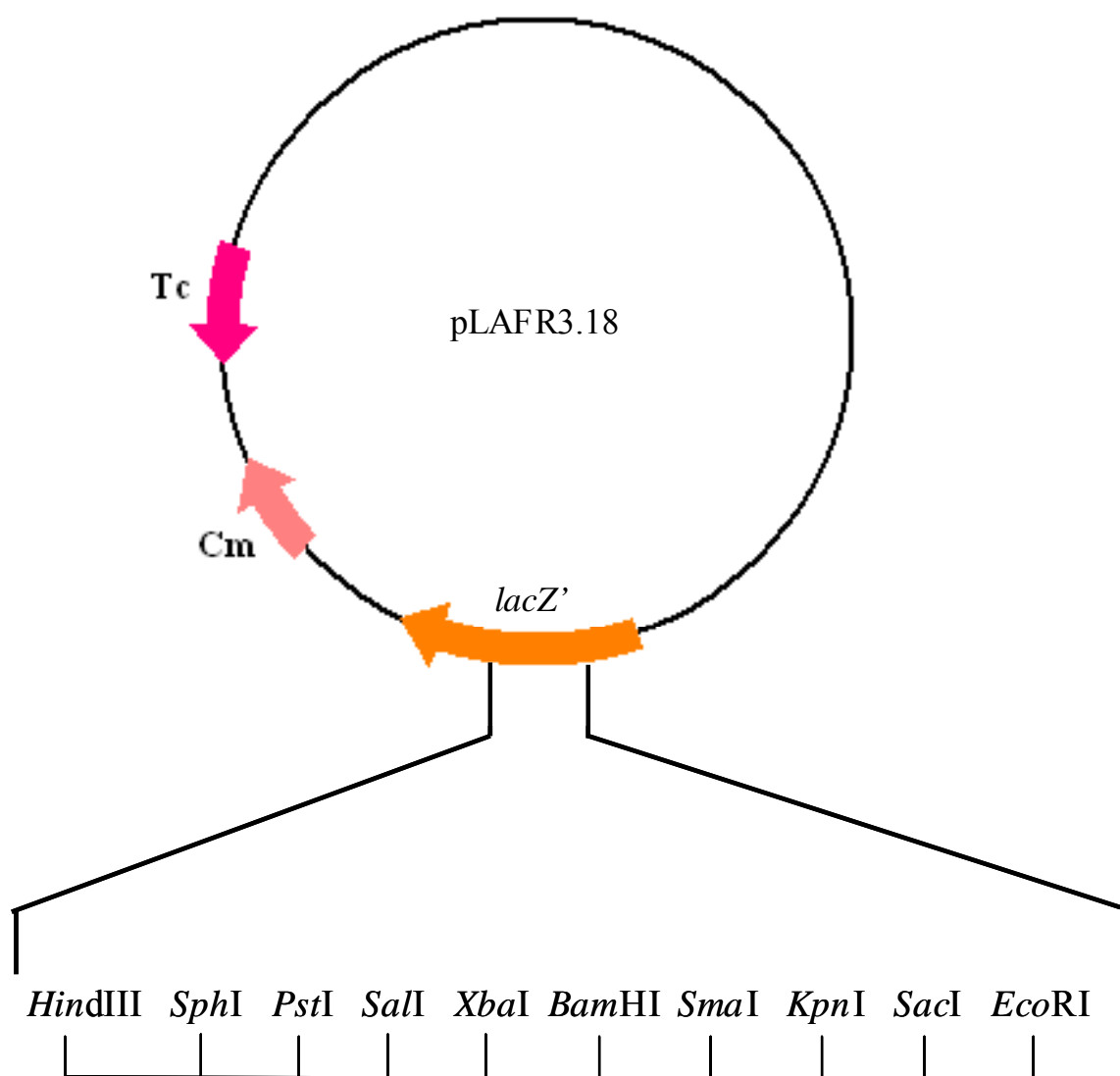
TATUSOV, R. L.; GALPERIN, M. Y.; NATALE, D. A.; KOONIN, E. V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 33-36, 2000.

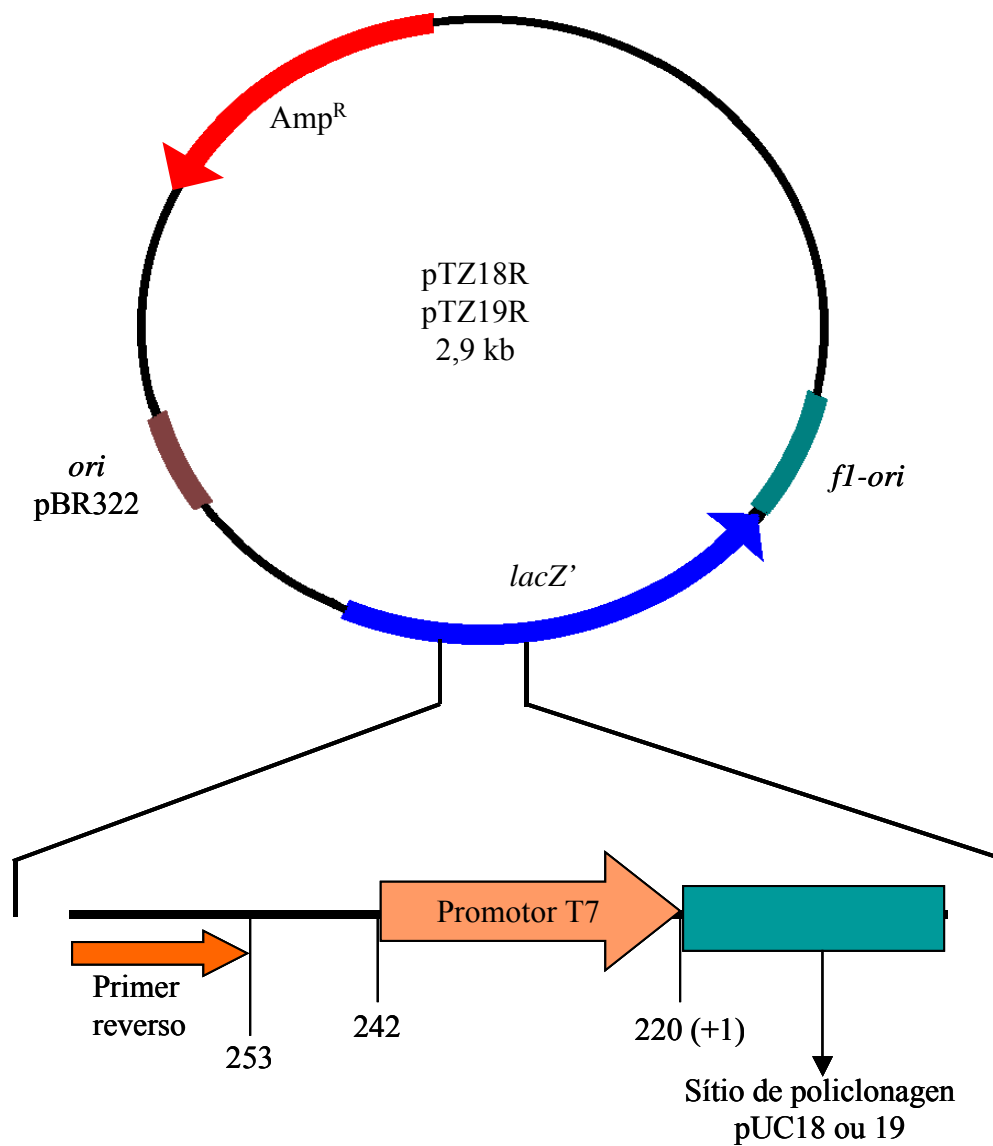
THOMAS, G. H.; MULLINS, J. G.; MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p.331-344, 2000.

- THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet.**, v. 16, p. 11-14, 2000.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, p. 849-850, 2001.
- van DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; de ZAMAROCZY, M. Methylammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 2652-2659, 1998.
- van HEESWIJK, W.; HOVING, S.; MOLENAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 133-146, 1996.
- van HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducer PII (GlnB) form heterotrimers *in vivo*: Fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 3942-3947, 2000.
- VASUDEVAN, S. G.; GEDYE, C.; DIXON, N. E.; CHEAH, E.; CARR, P. D. SUFFOLK, P. M.; JEFFREY, P. D.; OLLIS, D. L. *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallization and oligomeric structure. **FEBS Lett.**, v. 337, p. 255-258, 1994.
- VON WIREN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Topics Curr. Genet.**, v. 9, p. 95-120, 2004.
- WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.
- WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; REGO, F. G. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae* *nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.
- WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 8919-8923, 1988.
- WESTHOFF, C. M.; FERRERI-JACOBIA, M.; MAK, D. O.; FOSKETT, J. K. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 12499-12502, 2002.
- WESTHOFF, C. M.; SIEGEL, D. L.; BURD, C. G.; FOSKETT, J. K. Mechanism of genetic complementation of ammonium transport in yeast by human erythrocyte Rh-associated glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 17443-17448, 2004.
- XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; van HEESWIJK, W. C.; WESTHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**, v. 282, p. 149-165, 1998.

- YAKUNIN, A. F.; HALLENBECK, P. C. AmtB is necessary for NH_4^+ -induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 4081-4088, 2002.
- YOCH, D. C.; LI, J. D.; HU, C. Z.; SCHOLIN, C. Ammonia switch-off of nitrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* and *Methylosinus trichosporium*: no evidence for Fe protein modification. **Arch. Microbiol.**, v. 150, p. 1-5, 1988.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992.
- ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 152, p. 195-204, 1997.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and Functional Characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* Genes from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 983-992, 2000.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Effect of the PII and its homolog GlnK on reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase by heterologous expression of the *Rhodospirillum rubrum* dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase-dinitrogenase reductase-activating glyhodrolase regulatory System in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1610-1620, 2001a.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P.; Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6159-6168, 2001b.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 2782-2787, 2004.
- ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S.; WINKLER, F. K.; LI, X. D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 17090-17095, 2004.

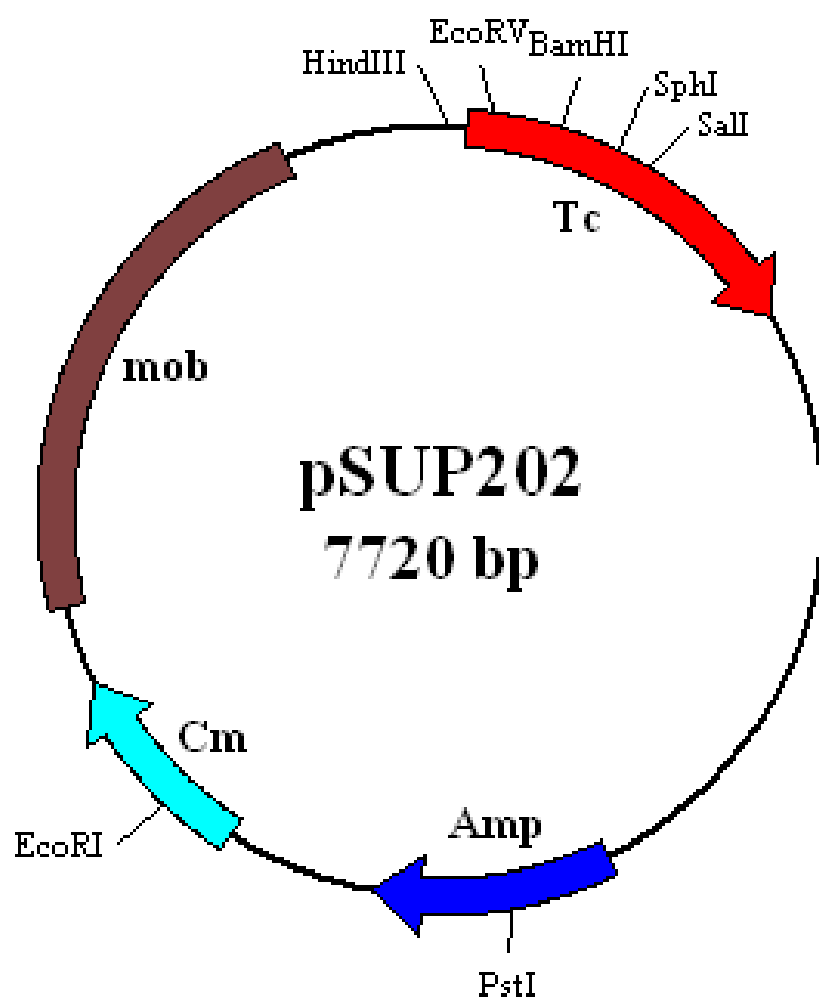
ANEXOS

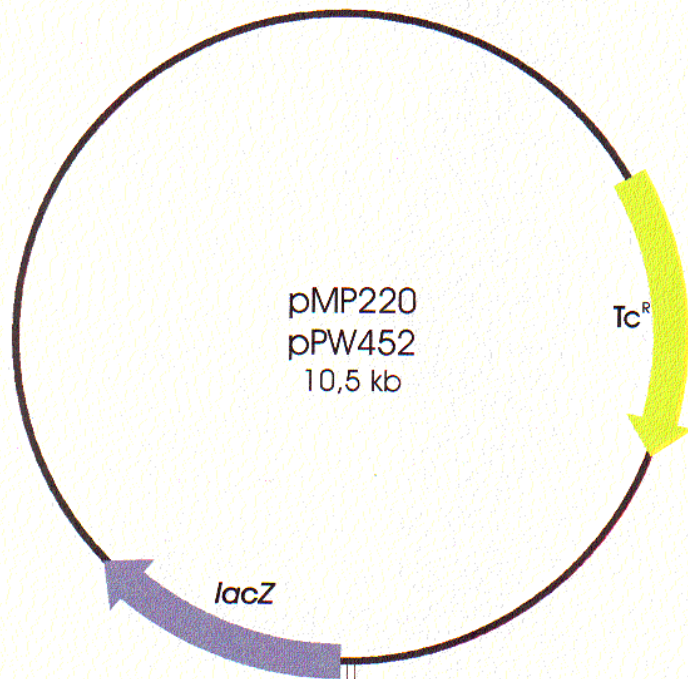




ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GAT CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
 EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC
 HindIII SphI PstI SalI XbaI BamHI SmaI KpnI SacI EcoRI





pMP220

*Hind*III *Bgl*II *Xba*I *Eco*RI *Kpn*I *Bam*HI *Xba*I *Pst*I *Sph*I *Hind*III

pPW452

*Hind*III *Sph*I *Pst*I *Xba*I *Bam*HI *Kpn*I *Eco*RI *Xba*I *Bgl*II *Hind*III